台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.3 2020

Research Articles

185 Determination of Contents of Total Phenol, Flavonoid, Triterpenoid and Peptide and *in Vitro* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Bitter Melon Extract

Chien-Ya Hung, Shu-Hui Yang, and Jaw-Neng Lin

193 Effects of Biogas Residue and Bagasse on Mushroom Production

Chi-Yung Huang, Bee-Yu Wei, Hsiang-Cheng Hung, and Yun-Sheng Lu

207 Chemical Screening and Field Trials for Controlling Pitaya Flower Wet Rot Caused by *Gilbertella persicaria*

Chu-Ping Lin, Jyh-Nong Tsai, Ting-Fang Hsieh, and Pao-Jen Ann

218 Effects of Temperature on Development and Reproduction of the Rove Beetle, *Paederus fuscipes* Curtis, Feeding on *Nilaparvata lugens* (Stål)

Shou-Horng Huang, Ching-Huan Cheng, and Po-Hung Chen

227 Optimization of Affecting Factors on Microspore Culture in Cabbage

Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, Chin-Yi Tsao, Tzu-Kai Lin, and Ming-Kun Chi

241 Etiology and Fungicide Screening of Coffee Brown Eye Spot Disease

Hui-Fang Ni, Ching-Yi Lin, and Chao-Jung Wu

Short Communication

255 Harvesting of *Mallada basalis* (Walker) Eggs Using a Hair Clipper and Cyclonic Separation

Pei-Chen Hsu, Yew-Jen Dong, Jih-Zu Yu, Feng-Chyi Lin, and Ming-Yao Chiang

ISSN 0022-4847

9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.69 No.3 2020

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.69 No.3 2020

研究報告

185 苦瓜萃取物總酚、類黃酮、三萜類、胜肽含量及體外抑制血管收縮素轉化酶能力之研究

洪千雅、楊淑惠、林照能

193 沼渣與蔗渣對菇類生產之影響

黃棨揚、魏碧玉、孔祥丞、呂昀陞

207 紅龍果花期與幼果濕腐病（病原*Gilbertella persicaria*）之藥劑篩選與田間防治

林筑蘋、蔡志濃、謝廷芳、安寶貞

218 溫度對青翅蟻形隱翅蟲（*Paederus fuscipes* Curtis）發育與繁殖之影響

黃守宏、鄭清煥、陳柏宏

227 甘藍小孢子培養影響因子之優化研究

夏奇鈮、陳威臣、曹進義、林子凱、紀銘坤

241 咖啡褐眼病之發生及防治藥劑篩選

倪蕙芳、林靜宜、吳昭蓉

研究簡報

255 應用電動推剪及旋風分離法收獲基徵草蛉［*Mallada basalis* (Walker)］卵粒

許北辰、董耀仁、佘志儒、林鳳琪、江明耀

行政院農業委員會農業試驗所出版

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(3):185–192 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202009_69(3).0001

Research Article

Determination of Contents of Total Phenol, Flavonoid, Triterpenoid and Peptide and *in Vitro* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Bitter Melon Extract

Chien-Ya Hung[1,*], Shu-Hui Yang[2], and Jaw-Neng Lin[3]

Abstract

Hung, C. Y., S. H. Yang, and J. N. Lin. 2020. Determination of contents of total phenol, flavonoid, triterpenoid and peptide and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of bitter melon extract. J. Taiwan Agric. Res. 69(3):185–192.

Bitter melon (*Momordica charantia* L.) is an important vegetable in the tropical countries. It is claimed to have beneficial effects because of its content of bioactive components. Hypertension has become a common global health problem leading to many chronic diseases, such as cardiovascular disease, renal disease and diabetes. The inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE) can help to regulate hypertension. In this study, we evaluated the ACE inhibitory activity of eight different lines of bitter melon extracts with the expectation for screening the line(s) with the potential of anti-hypertension. The results showed that the highest ACE inhibition rate in the extract of BM141 was 93.00% with IC_{50} value 15.18 mg mL^{-1}. According to the study, it could be concluded that bitter melon provided inhibition activity against ACE. The bitter melon containing higher total phenols, peptides and triterpenoids had higher ACE inhibition activity and be regarded as indicator components. Further research is needed to validate the antihypertensive ability in bitter melon using experimental animal models of hypertension.

Key words: Bitter melon, Antihypertension, Angiotensin-converting enzyme, Bioactive component.

INTRODUCTION

Bitter melon (*Momordica charantia* L.; BM), a member of the Cucurbitaceae family, is a tropical plant commonly found in Taiwan. Many studies regarding the biological activities of BM have been reported, such as its hypoglycemic, anti-bacterial, anti-viral, anti-tumor, anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetes, anthelmintic, antimutagenic, antilipolytic, hepatoprotective and anti-ulcerogenic properties (Jia *et al*. 2017). These beneficial effects are attributed to the various bioactive components of BM, including polysaccharides, peptides, tannins, terpenoids, saponins, flavonoids, sterols, glycosides, fatty acids and phenolic compounds. Furthermore, the most widely known is the effect of improving the condition of type 2 diabetes (Joseph & Jini 2013), and there are related BM health products on the market. Despite the promising biological activities of BM, only a few studies

Received: March 10, 2020; Accepted: June 30, 2020.
* Corresponding author, e-mail: chienya@fthes-tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung City, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellow and Head, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung City, Taiwan, ROC.
3 Assistant Research Fellow, Department of Vegetable Crops, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung City, Taiwan, ROC.

explained the antihypertensive effect of BM.

Hypertension has become a common global health problem which leads to many chronic diseases, such as cardiovascular disease, renal disease and diabetes. The human body regulates blood pressure mainly through the renin-angiotensin-aldosterone system to maintain body fluid and blood pressure. The liver releases angiotensinogen which is converted to angiotensin I via the secretion of renin. Then angiotensin I is converted to angiotensin II by angiotensin-converting enzyme (ACE). Angiotensin II has the effect on causing vasoconstriction and increasing the blood pressure. Therefore, by inhibiting ACE, angiotensin I cannot be converted to angiotensin II to reduce the resistance around the blood vessels and the blood pressure.

According to the National Health Survey of the Ministry of Health and Welfare in 2015–2018, the prevalence of hypertension in Taiwan over the age of 18 is about 25%. The American Heart Association redefined the hypertension standard in 2017. When the blood pressure reaches 130/80 mmHg (systolic pressure of 130 mmHg and diastolic pressure of 80 mmHg), it is called hypertension, and the blood pressure must be controlled below this level. Because the antihypertension drugs may cause some side effects, one appropriate way to improve the condition of hypertension is to find the food material possessing antihypertensive activity and put it into daily meals in combination with the lifestyle change.

It has been reported that polysaccharides in BM have ACE inhibitory effect (Tan & Gan 2016). Previous study indicated that whole-plant aqueous extract of BM dose dependently normalized the hypertension in hypertensive Dahl salt-sensitive rats, followed by acetylcholine mediated pathways (Ojewole *et al*. 2006). Moreover, BM is rich in many phytochemicals, such as polyphenols, flavonoids and triterpenoids, playing a role as an ACE inhibitor in regulating blood pressure (Balasuriya & Rupasinghe 2012). The objectives of this study were to evaluate the ACE inhibition activity of BM extracts and to determine the bioactive components relating to ACE inhibition activity.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

Freshly matured BMs from 8 breeding lines were provided by the Department of Vegetable Crops of Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung City, Taiwan. The inner tissues and seeds were removed and the flesh was chopped into small pieces and pressed into juice using a food blender. The juice was centrifuged at 2,500× *g* for 10 min and the supernatant was collected and dried in an oven at 65℃ for 2 h. The completely dried extract was dissolved in water to 30 mg mL^{-1} for further analysis. The percentage of extraction yield was calculated according to the following equation: (gram of dried extract/ gram of supernatant) × 100.

Inhibition assay of *in vitro* ACE

The BM extract and 100 μL of 1 mM hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) in a borate buffer were incubated at 37℃ for 5 min. Thereafter, 100 μL of 25 mU ACE solution was added to the reaction mixture and incubated at 37℃ for 60 min. The reaction was stopped by adding 150 μL of 1 N HCl (S). The control group (CK) was conducted to calculate the ACE inhibition activity. Dose-responsive enzyme inhibition activity was determined using different concentrations of each extract. The concentration of the tested extracts which could inhibit 50% of enzyme activity (IC_{50}) was calculated using linear regression analysis plot of % ACE inhibition versus concentrations of tested extract. Three better ACE inhibition activity of BM extracts were chosen for ACE IC_{50} analysis. The reaction mixtures were filtered through 0.45 μm polyvinyl difluoride (PVDF) syringe filters (Millex, Merck, Germany) for high performance liquid chromatography (HPLC)

analysis. The reaction product, hippuric acid (HA), was separated and quantified by a HPLC system (Primaide, Hitachi, Japan). A reverse phased C_{18} column (Purospher STAR, 250 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm, Merck, Germany) was used. The mobile phase was comprised of 0.1% trifluoroacetic acid in 50% methanol. The injection volume was 20 μL and flow rate was 0.8 mL min^{-1}. HA was detected by monitoring the absorbance at 228 nm.

The ACE inhibition rate was calculated from the following equation: ACE inhibition rate (%) = (CKarea − Sarea) ÷ (CKarea) × 100. CKarea is the peak area calculated by HPLC without adding sample; Sarea represents the peak area of the sample calculated by HPLC.

Determination of total phenol and total flavonoid contents

The total phenol content of BM extract was determined by the Folin-Ciocalteu method (Singleton *et al.* 1999) with slight modification, and the absorbance was measured at 765 nm in the spectrophotometer. Gallic acid was used as standard phenol and the total phenol content was subsequently calculated as gallic acid equivalent (GAE) per gram.

The total flavonoid content of BM extract was determined using the modified method (Meda *et al.* 2005), and the absorbance was measured at 405 nm. Quercetin was used as standard flavonoid and the total flavonoid content was subsequently calculated as quercetin equivalent (QE) per gram.

Determination of total triterpenoid and peptide content

The total triterpenoid content of BM extract was determined by the following steps. Take 0.1 mL of BM extract and load into micro-centrifuge tube, dry at 85℃, add 0.4 mL of 5% vanillin-acetate reagent and 0.8 mL of 70% perchloric acid, and react at 60℃ for 25 min. After cooling to room temperature (RT), 0.2 mL of acetic acid was added, mixed and reacted at RT for 15 min, then centrifuged (9,500× *g*, 3 min). The absorbance was measured at 548 nm. Oleanolic acid was used as standard triterpenoid and the total triterpenoid content was calculated as oleanolic acid equivalent (OAE) per gram.

The peptide content of BM extract was determined as follows. Mix 0.1 mL of extract with 1 mL *o*-phthalaldehyde colorimetric reagent, centrifuged (9,500× *g*, 1 min), and the absorbance was measured at 340 nm. The peptide content of the sample was calculated from the standard curve of L-leucine.

Statistical analysis

Samples were conducted in triplicate. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with SAS 7.1 package. Duncan's multiple range test was applied to determine significant differences among observed means ($P < 0.05$). Data are expressed as means ± standard deviation (SD) ($n = 3$). Correlations between the evaluated parameters were obtained using Pearson's correlation coefficient (r).

RESULTS AND DISCUSSION

There are many different types of BM, and the sizes and shapes naturally vary. The morphology of eight different breeding lines of BM selected for the study was shown in Fig. 1. BM141 is the smallest BM with pale green color. BM131, BM135, BM139 and BM142 had gently undulating and warty surface, while BM146, BM152 and BM156 had jagged surface. In order to evaluate the ACE inhibitory activity of BM, extracts of eight different lines of BM were tested using *in vitro* assay. As shown in Fig. 2, most of the BM extracts (30 mg mL^{-1}) showed potent antihypertensive activity. Higher ACE inhibition activities were found in the 30 mg mL^{-1} extracts of BM141, BM152, BM146, with inhibition rates of 93.00, 87.94 and 83.35%, respectively. Line BM139 had the lowest ACE inhibition activity at the inhibition rate of 14.82%. Then, a test to determine the IC_{50} value of BM141, BM152, BM146 and BM156 was

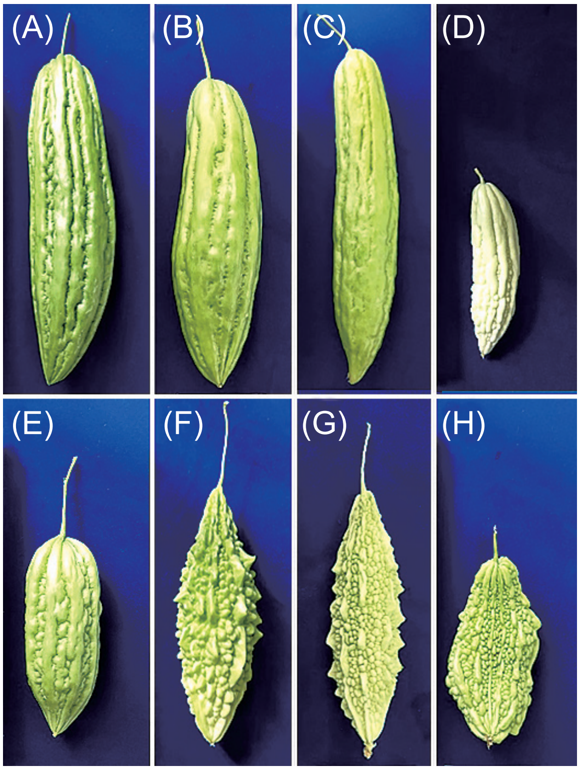

Fig. 1. The morphology of eight different lines of bitter melon fruits. (A) BM131; (B) BM135; (C) BM139; (D) BM141; (E) BM142; (F) BM146; (G) BM152; and (H) BM156.

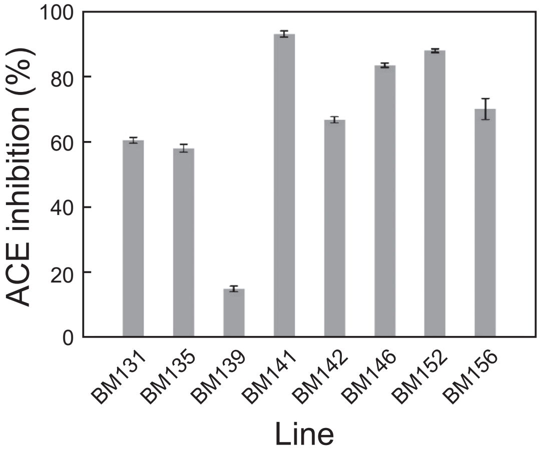

Fig. 2. The percentage of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition activity in the extracts of different lines of bitter melon. Error bars show standard deviation of the mean (n = 3). The aqueous extracts were 30 mg mL^{-1}.

conducted. Their IC_{50} values are listed in Table 1 (lower IC_{50} values mean stronger ACE inhibition activity). Dose-dependent (6–30 mg mL^{-1}) inhibition of ACE activity is plotted in Fig. 3. The highest inhibition activity was the extract of BM141, with IC_{50} value of 15.18 mg mL^{-1}, followed by the extract of BM152.

The total phenol, flavonoid, triterpenoid,

Table 1. The concentrations (IC_{50}) causing 50% inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) activity of the extracts from bitter melon lines of BM141, BM146, BM152 and BM156.

Line	ACE IC_{50} (mg mL^{-1})
BM141	15.18 ± 0.18 d[z]
BM146	20.51 ± 0.13 b
BM152	19.08 ± 0.05 c
BM156	25.16 ± 0.59 a

[z] Mean ± standard deviation (n = 3). Means within each column followed by the different letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

peptide content and extraction yield of BM extract were presented in Table 2. The extraction yields of extracts were ranged from 2.5% to 5.6%. Total phenol content of extracts were ranged from 2.44 mg to 7.94 mg GAE g^{-1}, total flavonoid content of extracts were ranged from 0.24 mg to 1.12 mg QE g^{-1}, and total triterpenoid content of extracts were ranged from 5.28 mg to 17.16 mg OAE g^{-1}. The peptide contents of extracts were ranged from 21.04 mg g^{-1} to 98.04 mg g^{-1}. The contents of total phenol, flavonoid, triterpenoid and peptide of BM141 extract were significantly higher ($P < 0.05$) than other BM lines (Table 2). Moreover, ACE inhibition rate exhibited positive correlation with total triterpenoid (r = 0.95), peptide (r = 0.82) and phenol (r = 0.76) contents of the extracts (Table 3).

Hypertension is a worldwide illness with many associated risk factors such as cardiovascular diseases and chronic renal failure. Some of the most effective medications for the treatment of hypertension are ACE inhibitors. ACE is an enzyme which can convert angiotensin I into angiotensin II in plasma, along with the contraction of myocardium and the increase of blood pressure. Therefore, one of the important therapeutic strategies for regulating blood pressure in hypertensive patients is the use of ACE inhibitors, which inhibit the conversion of angiotensin I to angiotensin II (Nyman *et al*. 1998). The inhibition activity of ACE plays an important role in lowering blood pressure (Corvol *et al*. 1995). Recently, it was reported that the phenolic and flavonoid compounds in BM leaves showed potential antihypertensive activity (Lestari *et al*. 2017). However, BM leaves are not traditional food materials in Taiwan, so we chose edible BM flesh as experimental materials instead. We evaluated the ACE inhibition activity in eight different lines of BM extracts and expected to screen the BM with the potential of antihypertension. The results showed that most of the BM extracts displayed *in vitro* ACE inhibitory activity and the highest inhibition activity was exhibited in the extract of BM141.

Previous study underlined the significant

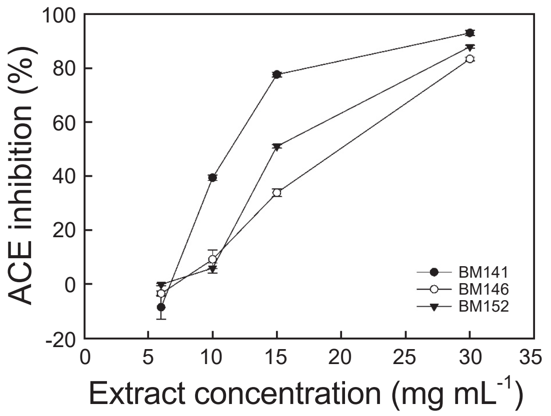

Fig. 3. The dose-response curves of the percentage of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition activity of the extracts from bitter melon lines of BM141, BM146 and BM152. Error bars show standard deviation of the mean (n = 3).

Table 2. Total phenol, flavonoid, peptide, triterpenoid and extraction yield of the extracts from different lines of bitter melon.

Line	Total phenol (mg GAE g^{-1})[z]	Total flavonoid (mg QE g^{-1})	Peptide (mg g^{-1})	Total triterpenoid (mg OAE g^{-1})	Extraction yield (%)
BM131	5.22 ± 0.10 d[y]	0.24 ± 0.04 f	31.66 ± 0.15 g	13.82 ± 0.01 d	3.5
BM135	3.17 ± 0.00 e	0.56 ± 0.02 d	58.81 ± 0.56 e	12.94 ± 0.21 e	3.8
BM139	2.44 ± 0.10 f	0.47 ± 0.00 e	21.04 ± 0.12 h	5.28 ± 0.07 g	2.5
BM141	7.94 ± 0.10 a	1.12 ± 0.02 a	98.04 ± 0.20 a	17.16 ± 0.17 a	5.6
BM142	7.50 ± 0.17 b	0.71 ± 0.04 c	59.91 ± 0.45 d	10.81 ± 0.19 f	2.7
BM146	6.72 ± 0.10 c	0.83 ± 0.00 b	65.05 ± 0.24 c	16.51 ± 0.17 b	3.1
BM152	5.22 ± 0.10 d	0.83 ± 0.00 b	66.07 ± 0.67 b	16.62 ± 0.20 b	3.2
BM156	6.89 ± 0.19 c	0.68 ± 0.02 c	42.74 ± 0.35 f	15.44 ± 0.25 c	2.6

[z] GAE: gallic acid equivalent; QE: quercetin equivalent; and OAE: oleanolic acid equivalent.
[y] Mean ± standard deviation (n = 3). Means within each column followed by the different letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test. The aqueous extracts were 30 mg mL^{-1}.

Table 3. Pearson correlation coefficients (r) of total phenol, flavonoid, peptide, triterpenoid and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition effect of the extracts from different lines of bitter melon.

Item	Total phenol	Total flavonoid	Peptide	Total triterpenoid
ACE inhibition	0.76*	0.69	0.82*	0.95*

*The correlation coefficients are significant at $P < 0.05$.

correlation between ACE inhibitory activity and polyphenols that dietary plants contain (Patten *et al*. 2012). Recent report indicated that phenolic-rich extracts from natural products inhibit ACE activity (Ademiluyi *et al*. 2016). Flavonoid and triterpenoid could be effective ACE inhibitors *in vivo* and *in vitro* (Morigiwa *et al*. 1986; Balasuriya & Rupasinghe 2012). Furthermore, it has been reported that two novel ACEI peptides were successfully screened and characterized from the thermolysin hydrolysate of BM seed proteins (Priyanto *et al*. 2015). Therefore, it would be interesting to study which component in BM is related to the ACE inhibitory activity. Results indicated that the ACE inhibition rate exhibited positive correlation with total phenol, triterpenoid, and peptide content of BM extracts calculated by Pearson correlation coefficients (Table 3). With that, the highest ACE inhibition activity of BM141 could be attributed to its highest total phenol, flavonoid, triterpenoid and peptide contents. Results also suggest that these recognized components as effective ACE inhibitors may contribute to the ACE inhibition activity in BM extracts.

However, even within the same variety, many factors including environmental factors, maturity, location, soil condition and cultivation practices, would affect the bioactive components in BM and their ACE inhibition activity. Further research is necessary to validate the antihypertensive ability in BM using experimental animal models of hypertension in the future.

CONCLUSION

Based on the results from this study, it could be concluded that BM provided inhibition activity against ACE. The highest ACE inhibition rate in the extract of BM141 was 93.00% with IC_{50} value 15.18 mg mL^{-1}. The ACE inhibition activity could be attributed to their total phenol, peptide and triterpenoid contents. Total phenol, peptide and triterpenoid contents play an active role in inhibiting ACE and could be regarded as indicator components

in BM for improving condition of hypertension.

REFERENCES

Ademiluyi, A. O., G. Oboh, O. B. Ogunsuyi, and F. M. Oloruntoba. 2016. A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. Comp. Clin. Pathol. 25:363–374. doi:10.1007/s00580-015-2192-y

Balasuriya, N. and H. P. V. Rupasinghe. 2012. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. Food Chem. 135:2320–2325. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.023

Corvol, P., T. A. Williams, and F. Soubrier. 1995. Peptidyl dipeptidase A: Angiotensin I-converting enzyme. Methods Enzymol. 248:283–305. doi:10.1016/0076-6879(95)48020-x

Jia, S., M. Shen, F. Zhang, and J. Xie. 2017. Recent advances in *Momordica charantia*: Functional components and biological activities. Intl. J. Mol. Sci. 18:2555. doi:10.3390/ijms18122555

Joseph, B. and D. Jini. 2013. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. Asian Pac. J. Trop. Dis. 3:93–102. doi:10.1016/S2222-1808(13)60052-3

Lestari, P., K. Rissyelly, and P. G. M. W. Mahayasih. 2017. Inhibition activity of angiotensin converting enzyme (ACE) and determination of total phenolic and flavonoid compound from bitter melon leaves (*Momordica charantia* L.). Pharmacogn. J. 9:252–256. doi:10.5530/pj.2017.2.43

Meda, A., C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, and O. G. Nacoulma. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem. 91:571–577. doi:10.1016/j.foodchem.2004.10.006

Morigiwa, A., K. Kitabatake, Y. Fujimoto, and N. Ikekawa. 1986. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidim*. Chem. Pharm. Bull. 34:3025–3028. doi:10.1248/cpb.34.3025

Nyman, U., P. Joshi, L. B. Madsen, T. B. Pedersen, M. Pinstrup, S. Rajasekharan, V. George, and P. Pushpangadan. 1998. Ethnomedical information and *in vitro* screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). J. Ethnopharmacol. 60:247–263. doi:10.1016/S0378-8741(97)00158-X

Ojewole, J. A. O., G. Olayiwola, and S. O. Adewole. 2006. Hypoglycaemic and hypotensive effects of *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) whole-plant aqueous extract in rats: Cardiovascular topics. Cardiovasc. J. S. Afr. 17:227–232.

Patten, G. S., M. Y. Abeywardena, R. J. Head, and L. E. Bennett. 2012. Processed dietary plants demonstrate broad capacity for angiotensin converting enzyme and angiotensin II receptor binding inhibition *in vitro*. J. Funct. Foods 4:851–863. doi:10.1016/j.jff.2012.06.002

Priyanto, A. D., R. J. Doerksen, C. I. Chang, W. C. Sung, S. B. Widjanarko, J. Kusnadi, Y. C. Lin, T. C. Wang, and J. L. Hsu. 2015. Screening, discovery, and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from proteolytic hydrolysate of bitter melon seed proteins. J. Proteom. 128:424–435. doi:10.1016/j.jprot.2015.08.018

Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. Methods Enzymol. 299:152–178. doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Tan, H. F. and C. Y. Gan. 2016. Polysaccharide with antioxidant, α-amylase inhibitory and ACE inhibitory activities from *Momordica charantia*. Intl. J. Biol. Macromol. 85:487–496. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.023

苦瓜萃取物總酚、類黃酮、三萜類、胜肽含量及體外抑制血管收縮素轉化酶能力之研究

洪千雅[1,*] 楊淑惠[2] 林照能[3]

摘要

洪千雅、楊淑惠、林照能。2020。苦瓜萃取物總酚、類黃酮、三萜類、胜肽含量及體外抑制血管收縮素轉化酶能力之研究。台灣農業研究 69(3):185–192。

苦瓜 (*Momoridica charantia* L.) 是熱帶國家重要的蔬果作物，苦瓜因富含機能性成分而具有許多保健功能，包括降血壓在內。高血壓是全球關切之健康問題，會衍生許多慢性疾病，如心血管疾病、腎臟病和糖尿病。血管收縮素轉化酶 (angiotensin-converting enzyme; ACE) 的抑制有助於高血壓的調控，本研究以 8 種苦瓜品系為原料，測定水萃物體外血管收縮素轉化酶抑制活性，期能協助篩選具調節血壓潛力之苦瓜品系。結果顯示，以 BM141 苦瓜萃取物的 ACE 抑制率最高，抑制率為 93.00%，IC_{50} 為 15.18 mg mL^{-1}。因此，根據試驗結果，苦瓜確實具有抑制血管收縮素轉化酶之活性。總酚、胜肽、三萜類含量相對高的苦瓜品系，其血管收縮素轉化酶抑制活性較高，可以作為調節血壓相關之指標成分。有關運用高血壓動物模式評估苦瓜降血壓能力，則有待進一步探討。

關鍵詞：苦瓜、高血壓、血管收縮素轉化酶、生物活性成分。

投稿日期：2020 年 3 月 10 日；接受日期：2020 年 6 月 30 日。

[*] 通訊作者：chienya@fthes-tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系助理研究員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系副研究員兼系主任。台灣 高雄市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(3):193–206 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202009_69(3).0002

研究報告

沼渣與蔗渣對菇類生產之影響

黃棨揚[1] 魏碧玉[2] 孔祥丞[3] 呂昀陞[1,*]

摘要

黃棨揚、魏碧玉、孔祥丞、呂昀陞。2020。沼渣與蔗渣對菇類生產之影響。台灣農業研究 69(3):193–206。

我國近年由於電能短缺之問題，因此積極開發綠能替代傳統化石能源進行發電，沼氣發電即為其中重要項目之一，惟沼氣發電後所產生沼渣之去化問題，成為限制沼氣發電之關鍵。為解決此一問題，本研究利用沼渣與蔗渣組合篩選出適合菇類生長之配方，藉以提供沼渣去化用途之參考。試驗結果顯示，以沼渣與蔗渣取代米糠所設計之配方，較單純米糠處理之對照在菌絲生長上對供試菇種菌絲生長有明顯提升。進一步選擇杏鮑菇進行栽培試驗，結果顯示沼渣與蔗渣處理組較單純米糠對照組，不論在菌絲生長速度與產量皆有所增加。此外，進一步分析菇體重金屬吸附情形，顯示杏鮑菇菇體不會吸附沼渣重金屬鉛，但對鎘、銅及鋅等具低吸附之能力。本試驗之結果顯示，沼渣與蔗渣混和之配方具有部分取代米糠之效果，且有助提升杏鮑菇之產能，在安全無虞的沼渣來源下，具未來可成為沼渣與蔗渣去化與增加這些資源物附加價值之應用參考。

關鍵詞：沼渣、蔗渣、杏鮑菇、循環農業。

前言

台灣近年來對於替代能源之需求越來越高，包含太陽光電與生質能源等不斷被開發與應用，其中沼氣發電更具有發展潛力。惟由於沼氣發電後會產生如沼渣之副產物尚未開發用途，因此仍未被廣泛推廣。其實沼渣含有豐富之纖維質與含氮物質，具有增加土壤有機質、改善土壤團粒結構及減少化肥使用量等功效，可被使用作為有機質肥料。然而，由於其銅與鋅離子的含量較高，因此使用限制較多。倘將大量剩餘之沼渣遺棄或任意堆放，將對環境造成 2 次汙染 (Zhang *et al*. 2016; Lu & Kong 2017)。因此，如何有效利用沼渣，或將之加值化成為沼氣利用，乃當前沼渣作為循環資源物的重要議題之一。

沼渣由於含有豐富氮素源與纖維質 (Zhang *et al*. 2016)，因此可被利用於菇類生產，目前已有相關研究指出沼渣可被應用於洋菇、雞腿菇、銀耳、平菇、黃白側耳與金針菇等菇種的生產 (Gou *et al*. 2007; Cao *et al*. 2008; Yu *et al*. 2012, 2014; Wei *et al*. 2017)。但是，也有研究指出雖然沼渣具有高氮素源特性，如能添加適當之碳素源，如葡萄糖與蔗糖等菇類菌絲容易利用之醣類，將有利於調整生產配方之碳氮比，提高菇類利用效率與生產量 (Wei *et al*. 2017)。

蔗渣係現行菇類栽培常用的農業資源物之一，由於蔗渣含有豐富之單醣與雙醣，因此相當適合作為菇類栽培時之替代資材 (Zhou *et al*. 2004)。據此，本研究分別選用國內重要之菇類 [如杏鮑菇 (*Pleurotus eryngii*)、秀珍菇 (*Pleurotus sajor-caju*)、鴻喜菇 (*Hypsizygus tessellatus*) 及美白菇 (*Hypsizygus marmoreus*) 等] 進行木屑平板試驗，測試不同沼渣與蔗渣

投稿日期：2019 年 11 月 19 日；接受日期：2020 年 5 月 6 日。
* 通訊作者：yunsheng@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 財團法人工業技術研究院材料與化工研究所資深研究員。台灣 新竹市。
[3] 財團法人工業技術研究院材料與化工研究所副研究員。台灣 新竹市。

取代米糠的比例對菇類菌絲生長之影響，並進一步選用杏鮑菇進行栽培試驗，以深入瞭解相關配方應用於杏鮑菇栽培之可行性。此外，並將分析菇體內重金屬含量與營養成分，以釐清沼渣、蔗渣取代米糠對杏鮑菇產量與品質之影響。

材料與方法

菌種保存與活化

本研究之供試菌株係由行政院農業委員會農業試驗所植病組菇類研究室所提供，杏鮑菇 (*P. eryngii*) 菌株代號為 PE-1、秀珍菇 (*P. sajor-caju*) 菌株代號為 PS-1、美白菇 (*H. marmoreus*) 菌株代號為 HM-1、鴻喜菇 (*H. tessellatus*) 菌株代號為 HT-1。供試菌株以馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 進行繼代培養，並放置於 24℃之恆溫箱中靜置培養。培養 7 d 後，以 7 mm 打孔器打取菌絲塊，並將菌絲塊放入無菌水保存管中，放置於 4℃冰箱中進行保存。菌株於試驗前，將菌絲塊自無菌水中取出，並放置於 PDA 培養基中進行活化，待 7 d 後即可進行相關試驗。

以木屑平板法測試沼渣、蔗渣取代米糠對菇類菌絲生長之影響

為瞭解沼渣、蔗渣是否具有取代米糠作為菇類氮素源之潛力，將供試菌株培養於添加 20 g 混合木屑的玻璃培養皿 (直徑 9 cm) 內。沼渣、蔗渣由工業技術研究院提供，其中沼渣是由豬糞尿經厭氧發酵產生沼氣後之剩餘產物經固液分離，收集固形物烘乾後形成；蔗渣則為國產甘蔗榨糖後剩餘之纖維狀固形物，在室外堆積發酵數月，經腐熟並風乾後之黑褐色纖維物，兩者成分分析如表 1。其餘試驗材料，木屑為菇類栽培業者常用，係相思木占 3 成之雜木屑，經室外灑水堆積 3 mo 後使用；當年度製造之米糠、粉頭原料，購自泰昌飼料行 (台灣台中市)。試驗共有 3 類處理組，分別為沼渣取代米糠組、蔗渣取代米糠組、沼渣與蔗渣取代米糠組。各處理配方如表 2，沼渣取代米糠組，混合木屑配方為：配方 1 (對照組)：

表 1. 厭氧發酵後沼渣與蔗渣的營養成分分析。

Table 1. Nutrient content in the pig manure biogas residue and sugarcane bagasse.

Material	pH value	EC value	C : N ratio	Organic matter	Nitrogen	Phosphoric oxide	Potassium oxide	Calcium oxide	Magnesium oxide	Heavy metal content (mg L^{-1})					
				Element present (%)						Cu	Zn	Cd	Ni	Cr	Pb
Pig manure-biogas residue	7.1	1.8	24.0	87.0	2.1	2.8	0.3	3.1	1.1	81.0	313.0	0.6	7.4	6.1	1.5
Bagasse	8.3	2.4	50.3	78.0	0.9	0.2	0.3	0.7	0.3	14.0	37.5	0.3	3.0	3.8	2.3
Rice bran	ND^z	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.8	87.0	0.3	1.5	0.3	1.5
Wheat middlings	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.6	71.2	0.2	1.4	0.8	0.6

^{z} ND: not done.

表 2. 試驗所用各處理配方。

Table 2. The compositions of treatments that used in the experiments.

Treatment	Composition of treatment (%)				
	Sawdust	Rice bran	Biogas residue	Bagasse	Wheat middlings
Replace rice bran with biogas residue					
Treatment 1 (control)	70	30	0	0	0
Treatment 2	70	20	10	0	0
Treatment 3	70	10	20	0	0
Treatment 4	70	0	30	0	0
Replace rice bran with bagasse					
Treatment 1 (control)	70	30	0	0	0
Treatment 2	70	20	0	10	0
Treatment 3	70	10	0	20	0
Treatment 4	70	0	0	30	0
Replace rice bran with biogas residue and bagasse					
Treatment 1 (control)	70	30	0	0	0
Treatment 2	70	10	15	5	0
Treatment 3	70	10	10	10	0
Treatment 4	70	10	5	15	0
Plastic bag assay					
Treatment 1 (control)	60	30	0	0	10
Treatment 2	60	10	15	5	10
Treatment 3	60	10	10	10	10

70% 木屑 + 30% 米糠；配方 2：70% 木屑 + 20% 米糠 + 10% 沼渣；配方 3：70% 木屑 + 10% 米糠 + 20% 沼渣；配方 4：70% 木屑 + 30%沼渣。蔗渣取代米糠組，混合木屑配方為：配方 1 (對照組)：70% 木屑 + 30% 米糠；配方 2：70% 木屑 + 20% 米糠 + 10% 蔗渣；配方 3：70% 木屑 + 10% 米糠 + 20% 蔗渣；配方 4：70% 木屑 + 30% 蔗渣。沼渣與蔗渣取代米糠組，混合木屑配方為：配方 1 (對照組)：70% 木屑 + 30% 米糠；配方 2：70% 木屑 + 10% 米糠 + 15% 沼渣 + 5% 蔗渣；配方 3：70% 木屑 + 10% 米糠 + 10% 沼渣 + 10% 蔗渣；配方 4：70% 木屑 + 10% 米糠 + 5% 沼渣 + 15% 蔗渣。每處理 5 重複，培養條件為 24℃全黑暗，並於培養後 10 d 記錄菌落大小。本試驗進行 2 重複。

杏鮑菇木屑菌種製備

以乾重比 85：15 混合鋸木屑與米糠後，再將含水量調整到 60–65%，分裝於菌種瓶後密封瓶口，經高溫高壓 (121℃ , 1.2 kg cm^{-2}) 滅菌釜滅菌 1 h。待隔夜冷卻後，將培養於 PDA 平板之杏鮑菇 PE-1 菌絲塊切下接種，轉培養於 24℃下直到菌絲走滿，供作後續試驗菌種之用。

測試沼渣與蔗渣對杏鮑菇走菌與產量影響

為瞭解沼渣、蔗渣是否具有取代米糠作為菇類氮素源之潛力，本研究根據平板走菌研究之結果，以不同比例之沼渣、蔗渣的木屑太空包種植杏鮑菇 PE-1。所製備不同木屑太空包分別為配方 1 (對照組)：木屑 60% + 米糠 30% + 粉頭 10%；配方 2：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 15% + 蔗渣 5 %；配方 3：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 10% + 蔗渣 10%。試驗所使用之各木屑太空包材料，經過充分混拌後，將含水量調整至 60–65%，

分裝成每包濕重約 1 kg 之太空包。經過高溫滅菌釜以高溫高壓 (121℃, 1.2 kg cm^{-2}) 滅菌 1 h 後，移入冷卻室中隔夜冷卻，接種杏鮑菇 PE-1 菌株木屑菌種後，移入走菌室於 24℃定溫培養。走菌時期不照光，走菌過程中每處理隨機挑取 6 包太空包記錄杏鮑菇菌絲走菌速度，並記錄走菌完成之時間。走菌完成時，將太空包剔除汙染與生長異常者後，移入出菇室中。出菇室內溫度調整在 16–18℃，並以超音波加濕機將空氣中含水量調整在 85–92%，室內二氧化碳濃度控制在 900–2,000 mg L^{-1}。待菇體發育至長度 5 cm 且菌傘尚未反摺前，提高二氧化碳濃度至 2,000 mg L^{-1}。每包太空包只於菇體開傘前採收 1 次，菇體切除基部木屑後，調查各處理之產量與採收所需天數。根據菇體大小進行分級，其中 A 級標準為菇長 15 cm 以上、B 級標準為菇長 8–15 cm 間、C 級標準為 8 cm 以下者。每處理 40 框，每框 12 包，各 480 包重複。

重金屬、胺基酸及營養成分分析

為測定杏鮑菇是否吸附沼渣內部重金屬，每處理隨機收集 600 g 菇體，分析鎘、銅、鉛及鋅濃度，並評估沼渣、蔗渣對杏鮑菇體營養影響，分析不同處理杏鮑菇菇體粗蛋白、粗脂肪、水分及灰分，以及以酸解法分析菇體中 17 種胺基酸含量。本試驗皆委託振泰檢驗公司 (台灣新北市) 執行，因該實驗室為 Taiwan Food and Drug Administration (TFDA) 與 Taiwan Accreditation Foundation (TAF) 驗證實驗室，每試驗 1 重複已有公信力。各檢測方法如下。

重金屬檢測方法

菇類重金屬檢驗參考 Lin *et al*. (2015) 的方法，測定蔬菜中的重金屬。秤取 0.25 g 菇類烘乾樣品，加入 5.5 mL 混合酸液 (HNO_3 : H_2O_2 = 10 : 1, v/v)，以微波消化裝置 (MARS 5, CEM, Mathews, NC, USA) 加熱分解。加熱條件如下：第 1 階段功率設定 1,600 W、升溫時間 10 min、溫度設定 180℃、持溫時間 5 min。第 2 階段功率設定 1,600 W、升溫時間 5 min、溫度設定 200℃、持溫時間 10 min。分解液以 Whatman No. 42 濾紙過濾，以去離子水定量至 50 mL。濾液以感應耦合電漿質譜儀 (inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS) (Agilent 7900, Santa Clara, CA, USA) 測定鎘、銅、鉛及鋅濃度。4 種重金屬檢驗操作條件參考衛生福利部出版之部授食字第 1031901169 號-重金屬檢驗方法總則。

胺基酸分析方法

菇體樣品烘乾後，採液相水解法將蛋白質分解為胺基酸，步驟如下：將 500 μg 凍乾菇體與含有 0.1–1.0% 酚之 6 N 鹽酸於水解試管混合，在試管中加入鹽酸水解溶液 200 μL，並於乾冰-丙酮浴中冷凍檢品，再於真空中過火密封。檢品置於真空或惰性氣體中，置於 110℃水解 24 h 後，將胺基酸液以高效能液相層析儀 (Agilent 1100 HPLC‧2000 Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 配合管柱 (Zorbax Eclipse-AAA Columns, Agilent, Santa Clara, CA, USA) 進行 17 種氨基酸分析。胺基酸定量方法採：管柱後鄰苯二甲醛 (OPA) 螢光偵測與管柱前 FMOC-Cl 衍生化法 (TFDA-4043 草案-胺基酸分析法-十二、附錄方法二、方法七)。

粗蛋白、粗脂肪、水分及灰分分析方法

不同配方之菇體營養成分分析項目為：粗蛋白、粗脂肪、水分及灰分。分析方式參照經濟部標準檢驗局文件 CNS 5033-食品中水分之檢驗方法、CNS 5034 食品中粗灰分之檢驗方法、CNS 5035 食品中粗蛋白質之檢驗方法、CNS 5036 食品中粗脂肪之檢驗方法進行分析。試驗方法如下：水分分析為在已乾燥至恆量之秤量瓶中，精確 2–5 g 重菇檢體後，移至於 100–110℃烘箱中，秤量瓶微開，持續乾燥 1–2 h。取出移入乾燥器放冷，約 30 min 後秤量，再將秤量瓶移入烘箱中，乾燥 1–2 h。重複此步驟，直至恆量為止。含水量 (%) = [(秤量瓶重量 + 檢體重量) − 恆量後含秤量瓶記錄重量]/(秤量瓶 + 檢體重量 − 秤量瓶重量) × 100。灰分分析為精秤 2–5 g 菇體後，置於 100℃烘箱內充分乾燥，並移入灰化爐使溫度上升至 550–600℃。灰化數小時後，待檢體呈

白色或灰白色灰分，使溫度下降至 200℃，移入乾燥器中，待室溫時取出迅速秤量。灰分計算 (%) = (灰化後坩鍋與粗灰分重量 − 坩鍋重量)/檢體重量 × 100。粗蛋白分析為精秤含氮量約 2–3 mg 之菇體，置於分解瓶中，加入由硫酸銅與硫酸鉀分解以 1：4 混合之分解促進劑 0.5 g 及 98% 硫酸 3–5 mL，搖勻後稍微放冷。加入 30% 之過氧化氫溶液 1 mL，並用酒精燈緩慢加熱至菇體碳化。加熱煮沸至分解液轉為透明無色或極淡之藍色後，再繼續加熱 1–2 h，並緩慢加水 20 mL 後置於蒸餾裝置上。在蒸餾裝置中加入 0.05 N 之 98% 硫酸溶液 25 mL 後，滴入 2–3 滴混和指示劑 (Brunswik 試液，將甲基紅 0.2 g 與亞甲藍 0.1 g 融於 300 mL 乙醇，並過濾雜質) 後，將冷凝管末端浸於液面下，從小漏斗加入 30% 氫氧化鈉溶液 25 mL，進行水蒸氣蒸餾。至餾出液約 100 mL 後，使冷凝管末端離開液面，取出餾出液數 (mL)，與少量水沖洗冷凝管末端之洗液併為檢液，供 0.05 N 氫氧化鈉溶液滴定，至檢液由紫紅色轉綠色。以 0.05 N 硫酸溶液做空白對照組，每毫升硫酸含量 0.7003 mg 之氮。粗蛋白質 (%) = 0.7003 × (空白對照組中和 − 本檢液中和所用之 0.05 N 氫氧化鈉 mL 數) × 氮係數 × 0.05 N 氫氧化鈉標準溶液力價 × 100/檢體之採取量 (mg) × 使用分解液一部分滴定時應乘其係數。粗脂肪分析為精秤已為粉狀之檢體 2–10 g，放入圓筒濾紙中，在其上輕塞適量脫脂棉，置於適當容器內於 100–105℃烘箱乾燥 2–3 h，再置於乾燥器放冷，將圓筒濾紙置入抽出管中，加 1/2 燒瓶容量之乙醚，於 60–70℃水浴上萃取至少 8 h。取出圓筒濾紙，接回冷凝管，在水浴上加溫至燒瓶中之乙醚幾乎蒸乾後，卸下燒瓶，置於水浴上繼續蒸乾乙醚。將燒瓶外擦拭乾淨後，置於 98–100℃烘箱乾燥 1 h，將燒瓶移入乾燥器中放冷 30 min，秤重至恆量。粗脂肪量 (%) = [(抽出粗脂肪經乾燥後連燒瓶之重量 − 放有沸石燒瓶之重量)/檢體重量] × 100。

數據分析方法

本次試驗所得數據，以 SPSS (統計產品與分析服務解決方案，Statistical Product and Service Solutions) 版本 12.0 軟體分析，處理間以單因子變異數分析，並最小平方法 (least significant difference; LSD) 於 95% 信賴區間進行檢驗，評估處理間有無統計上顯著差異。

結果

以木屑平板法測試沼渣、蔗渣取代米糠對菇類菌絲生長之影響

為測試沼渣、蔗渣取代米糠後對菇類生長之影響，本研究先以木屑平板法測試沼渣與蔗渣取代米糠對菇類菌絲生長的影響，再依據菌絲生長情況找出最佳比例，篩選出混合沼渣與蔗渣取代米糠之配方。在沼渣取代米糠試驗中，發現 4 種供試菌株皆有類似結果，沼渣取代米糠比例越高，則菌落生長速度越快 (表 3)，在 95% 信賴區間下，供試菌株的處理 4 具有最大顯著差異。惟菌絲生長緻密度則與沼渣添加含量成反比 (圖 1)，在蔗渣取代處理試驗中，配方 4 以蔗渣全部取代米糠會造成供試菇種菌落直徑 (diameter) 變小，但 10% 蔗渣處理的配方 2 菌落範圍大於其他兩種處理。在 95% 信賴區間下，杏鮑菇處理與對照組沒有明顯差異，各處理數據如表 4。混合沼渣、蔗渣取代米糠試驗結果如表 5，杏鮑菇以配方 3 之菌落最大 (可達 47.4 mm)，其次為配方 2 (45.2 mm)、配方 4 (44.0 mm)，配方 1 對照組則為 41.6 mm，在 95% 信賴區間下配方 3 與對照組間存在顯著差異。秀珍菇以配方 2 之菌落最大 (可達 80.4 mm)，其次為配方 3 (76.8 mm)、配方 4 (76.6 mm)，配方 1 對照組則為 70.4 mm，在 95% 信賴區間下配方 3 與對照組間存在顯著差異，然配方 2、3、4 之間無顯著差異。美白菇以配方 3 之菌落最大 (可達 42.8 mm)，其次配方 2 (41.6 mm)、配方 4 (40.8 mm)，對照組則為 36.6 mm，在 95% 信賴區間下配方 3 與對照組間存在顯著差異，惟配方 2、3、4 之間無顯著差異。鴻喜菇以配方 3 之菌落最大 (可達 49.2 mm)，其次配方 4 (48.2 mm)、配方 2 (46.6 mm)，對照組則為 45.2 mm，在 95% 信賴區間下配方 3 與對照組間存在顯著差異。

表 3.　以沼渣取代米糠對菇類菌落生長之影響。

Table 3.　Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue on the colony diameter of mushrooms.

Treatment	The colony diameter of mushrooms (mm)[z]			
	Pleurotus eryngii	*Pleurotus sajor-caju*	*Hypsizygus marmoreus*	*Hypsizygus tessellatus*
Treatment 1 - control[y]	51.6 c[x]	75.6 b	41.6 d	43.4 c
Treatment 2 - 20% rice bran + 10% biogas residue	53.2 c	84.6 a	47.8 c	51.6 b
Treatment 3 - 10% rice bran + 20% biogas residue	56.2 bc	82.8 a	52.8 b	57.2 a
Treatment 4 - 30% biogas residue	62.2 a	88.6 a	57.0 a	59.0 a

[z] Bagasse was inoculated at 24℃.
[y] Treatment 1: 70% sawdust + 30% rice bran; Treatment 2: 70% sawdust + 20% rice bran + 10% biogas residue; Treatment 3: 70% sawdust + 10% rice bran + 20% biogas residue; and Treatment 4: 70% sawdust + 30% biogas residue.
[x] The colony sizes by the same letter in the same column are not significantly different ($P < 0.05$) by the least significant difference (LSD) test.

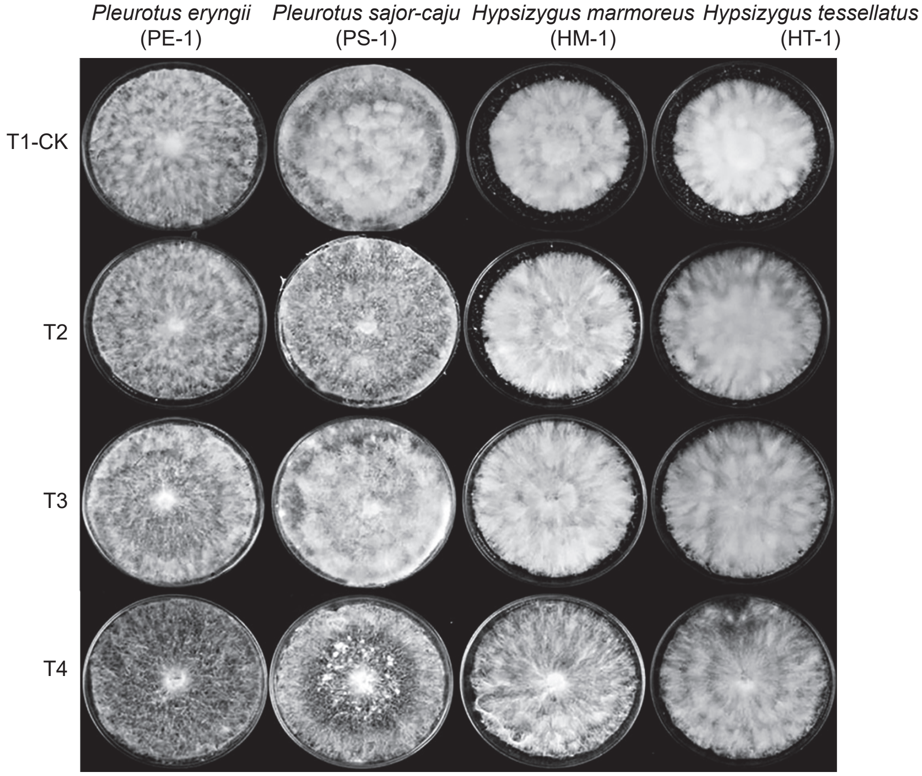

圖 1.　以沼渣取代米糠後對菇類菌落生長之影響。各處理組配方如下：配方 1 (對照組)：70% 木屑 + 30% 米糠；配方 2：70% 木屑 + 20% 米糠 + 10% 沼渣；配方 3：70% 木屑 + 10% 米糠 + 20% 沼渣；配方 4：70% 木屑 + 30% 沼渣。菌落在 24℃下培養 16 d。供試菌株包含杏鮑菇 cv. PE-1、秀珍菇 cv. PS-1、美白菇 cv. HM-1、鴻喜菇 cv. HT-1。

Fig. 1.　Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue on the colony size of mushrooms. Colonies were inoculated at 24℃ for 16 d. Treatment 1: 70% sawdust with 30% rice bran; Treatment 2: 70% sawdust with 20% rice bran and 10% biogas residue; Treatment 3: 70% sawdust with 10% rice bran and 20% biogas residue; and Treatment 4: 70% sawdust with 30% biogas residue. With the increasing rate of biogas residue, the mycelium is getting thinner. The varieties of *Pleurotus eryngii* cv. PE-1, *Pleurotus sajor-caju* cv. PS-1, *Hypsizygus marmoreus* cv. HM-1 and *Hypsizygus tessellatus* cv. HT-1 were tested in this experiment.

表 4. 以蔗渣取代米糠對菇類菌落生長之影響。

Table 4. Effects of replacement of rice bran with various percentages of bagasse on the colony diameter of mushrooms.

Treatment	The colony diameter of mushrooms (mm)[z]			
	Pleurotus eryngii	*Pleurotus sajor-caju*	*Hypsizygus marmoreus*	*Hypsizygus tessellatus*
Treatment 1 - control[y]	62.4 a[x]	82.2 a	55.0 a	55.8 ab
Treatment 2 - 20% rice bran + 10% bagasse	62.8 a	87.2 a	57.2 a	56.8 ab
Treatment 3 - 10% rice bran + 20% bagasse	61.0 a	90.0 a	54.0 a	57.6 a
Treatment 4 - 30% bagasse	46.8 b	77.4 b	44.0 b	46.0 b

[z] Bagasse was inoculated at 24℃.
[y] Treatment 1: 70% sawdust + 30% rice bran; Treatment 2: 70% sawdust + 20% rice bran + 10% bagasse; Treatment 3: 70% sawdust + 10% rice bran + 20% bagasse; and Treatment 4: 70% sawdust + 30% bagasse.
[x] The colony sizes by the same letter in the same column are not significantly different ($P < 0.05$) by the least significant difference (LSD) test.

表 5. 以沼渣與蔗渣取代米糠對菇類菌落生長之影響。

Table 5. Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue and bagasse on the colony diameter of mushrooms.

Treatment	The colony diameter of mushrooms (mm)[z]			
	Pleurotus eryngii	*Pleurotus sajor-caju*	*Hypsizygus marmoreus*	*Hypsizygus tessellatus*
Treatment 1 - control[y]	41.6 b[x]	70.4 b	36.6 b	45.2 b
Treatment 2 - 15% biogas residue + 5% bagasse	45.2 ab	80.4 a	41.6 ab	46.6 a
Treatment 3 - 10% biogas residue + 10% bagasse	47.4 a	76.8 a	42.8 a	49.2 a
Treatment 4 - 5% biogas residue + 15% bagasse	44.0 ab	76.6 a	40.8 ab	48.2 a

[z] Bagasse was inoculated at 24℃ for 10 d.
[y] Treatment 1: 70% sawdust + 30% rice bran; Treatment 2: 70% sawdust + 10% rice bran + 15% biogas residue + 5% bagasse; Treatment 3: 70% sawdust + 10% rice bran + 10% biogas residue + 10% bagasse; and Treatment 4: 70% sawdust + 10% rice bran + 5% biogas residue + 15% bagasse.
[x] The colony sizes by the same letter in the same column are not significantly different ($P < 0.05$) by the least significant difference (LSD) test.

不同營養配方對杏鮑菇菌絲生長與產量之影響

為瞭解以沼渣與蔗渣取代米糠對杏鮑菇菌絲生長之影響，本研究共設計有 3 種配方，經於 24℃培養室中培養 21 d 後，各配方間之平均走菌距離分別為配方 1：5.96 cm、配方 2：7.83 cm、配方 3：11.06 cm，3 者在 95% 信賴區間統計上皆有顯著差異。而培養 32 d 之走菌平均距離分別為配方 1：10.6 cm、配方 2：15.7 cm 與配方 3：16.3 cm，其中配方 2、配方 3 統計上與配方 1 具有顯著差異，但兩者之間沒有顯著差異 (表 6)。最後，配方 3 於接種後 37 d 走菌完成，配方 2 於接種後 40 d 走菌完成，對照組於接種後 45 d 走菌完成。

為瞭解以沼渣與蔗渣取代米糠對杏鮑菇產量之影響，本研究將走菌完成後之杏鮑菇太空包於第 45 天移入環控栽培庫間進行栽培試驗，其中配方 2、3 於刺激出菇 14 d 後進行採收，對照組於刺激出菇後 15 d 進行採收，不同配方之每包產量分別為配方 1：194.70 g ± 5.31 g、配方 2：211.31 g ± 5.46 g、配方 3：220.20 g ± 2.66 g (如圖 2)，在 95% 信賴區間下，3 種配方間皆有顯著差異。進一步依市場分級標準進行分類，配方 1：A 級菇占 31.6%、B 級菇占 42.2%、C 級菇占 26.2%；配方 2：A 級菇占 37.2%、B 級菇占 43.3%、C 級菇占 19.5%；配方 3：A 級菇占 26.0%、

表 6. 以沼渣與蔗渣取代米糠後對杏鮑菇太空包走菌距離之影響。

Table 6. Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue and bagasse on the distance of mycelium runner of *Pleurotus eryngii*.

Treatment	The distance of mycelium runner (cm)[z]			
	21 d	28 d	32 d	35 d
Treatment 1 - control[y]	6.0 c[x]	8.8 c	10.6 b	11.1 c
Treatment 2 - 15% biogas residue + 5% bagasse	7.9 b	11.7 b	15.7 a	16.8 b
Treatment 3 - 10% biogas residue + 10% bagasse	11.1 a	14.8 a	16.3 a	17.8 a

[z] Bagasse was inoculated at 24℃.
[y] Treatment 1: 60% sawdust + 30% rice bran + 10% wheat middlings; Treatment 2: 60% sawdust + 10% rice bran + 10% wheat middlings + 15% biogas residue + 5% bagasse; Treatment 3: 60% sawdust + 10% rice bran + 10% wheat middlings + 10% biogas residue + 10% bagasse.
[x] The colony sizes by the same letter in the same column are not significantly different ($P < 0.05$) by the least significant difference (LSD) test.

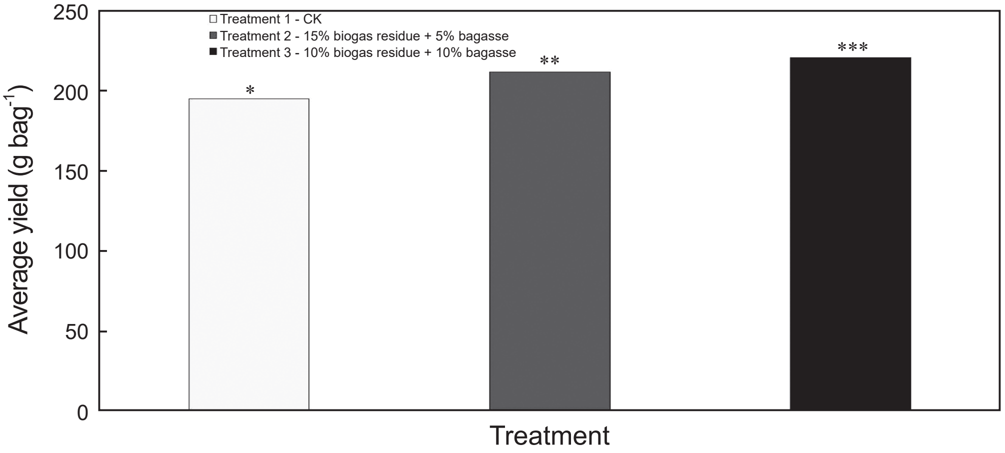

圖 2. 以沼渣與蔗渣取代米糠後對杏鮑菇平均產量之差異。各配方如下：配方 1：木屑 60% + 米糠 30% + 粉頭 10%；配方 2：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 15% + 蔗渣 5%；配方 3：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 10% + 蔗渣 10%。相同星號表示以 ($P < 0.05$) 在 LSD 統計上沒有顯著差異。

Fig. 2. Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue and bagasse on the average yield of *Pleurotus eryngii*. Treatment 1: 60% sawdust with 30% rice bran and 10% wheat middlings; Treatment 2: 60% sawdust with 10% rice bran, 10% wheat middlings, 15% biogas residue and 5% bagasse; and Treatment 3: 60% sawdust with 10% rice bran, 10% wheat middlings, 10% biogas residue and 10% bagasse. *: the average yields by the same star column are not significantly different ($P < 0.05$) by the least significant difference (LSD) test.

B 級菇占 51.7%、C 級菇占 22.3% (如圖 3)。依本次栽培試驗結果顯示，配方 2、3 之產量皆略高於配方 1，且配方 1 之標準差較大顯示其產生之菇體產量變異極大。又配方 2 與配方 3 菇體產量穩定高於配方 1，達 200 g 以上 (圖 4)，顯示利用此兩配方相較於配方 1 (對照組) 可有效且穩定提升杏鮑菇之產能。此外，經分析其 A、B、C 級菇所占之比例，亦可發現配方 2 與配方 3 中 C 級菇所占之比例最少，而配方 1 所占之比例最高。

重金屬、胺基酸及營養成分分析

為瞭解沼渣中重金屬成分是否會被杏鮑菇吸附，進而影響人體健康，本研究將不同配方處理組杏鮑菇菇體進行鉛、鎘、銅及鋅含量分析。發現處理組皆未檢出重金屬鉛，對照組 (配方 1) 重金屬鎘、銅濃度皆高於配方 2、3 兩處理組。對照組鎘濃度為 0.2 mg L^{-1}，配方 2 與配方 3

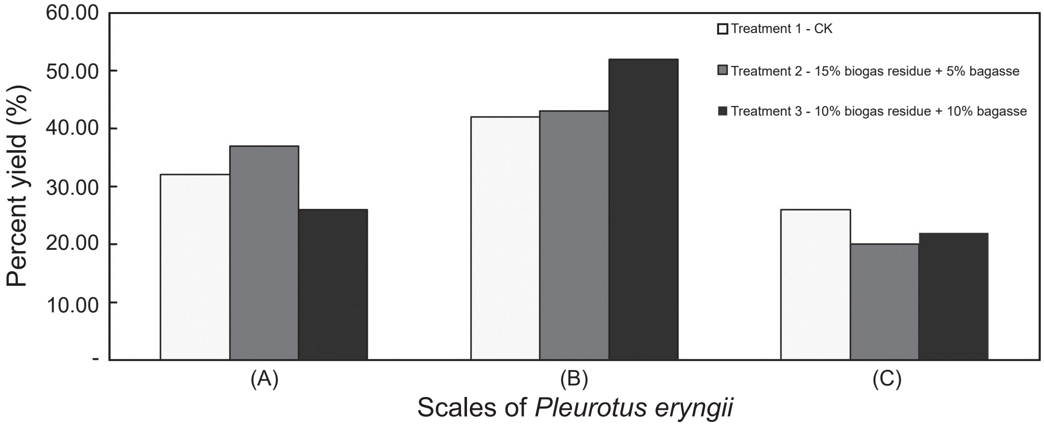

圖 3. 用沼渣與蔗渣取代米糠後對杏鮑菇產量分級差異。圖為不同菇型大小分級，(A) 菇體 15 cm 以上；(B) 菇體 8–15 cm；(C) 菇體 8 cm 以下。各配方如下，配方 1：木屑 60% + 米糠 30% + 粉頭 10%；配方 2：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 15% + 蔗渣 5%；配方 3：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 10% + 蔗渣 10%。

Fig. 3. Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue and bagasse on the yield-scale difference of *Pleurotus eryngii*. The yield-scale is based on mushroom size: (A) over 15 cm; (B) between 8–15 cm; and (C) below 8 cm. Treatment 1: 60% sawdust with 30% rice bran and 10% wheat middlings; Treatment 2: 60% sawdust with 10% rice bran, 10% wheat middling, 15% biogas residue and 5% bagasse; and Treatment 3: 60% sawdust with 10% rice bran, 10% wheat middlings, 10% biogas residue and 10% bagasse.

皆為 0.10 mg L^{-1}；對照組銅濃度為 5.59 mg L^{-1}，配方 2 為 3.14 mg L^{-1}、配方 3 為 2.67 mg L^{-1}；鋅濃度則以配方 2 最高 (48.70 mg L^{-1})，對照組 45.30 mg L^{-1} 單位不分行次之，配方 3 之 33.90 mg L^{-1} 最少。重金屬分析結果顯示，配方 2、3 雖然使用重金屬含量風險較高的沼渣替代米糠作為太空包氮源，但杏鮑菇的低重金屬吸附效果仍使沼渣具有取代米糠的潛力。當然，安全無虞的沼渣來源是必要前提。

菇體營養分析中，以對照組每 100 g 菇體含有最高的粗蛋白 (2.6 g)，配方2、3分別為2.1 g、2.0 g。粗脂肪含量亦以對照組每 100 g 菇體含有 0.4 g 最高，配方 3 的 0.3 g 次之，配方 2 的 0.2 g 最少。菇體含水量以配方 3 的 87.9% 最高，配方 2 為 87.6%，對照組的 86.6% 最少。菇體灰分以對照組每 100 g 菇體有 0.6 g 最高，配方 2、3 皆為 0.5 g (表 7)。本次菇體胺基酸共測試包含天門冬胺酸、絲胺酸、組胺酸在內等 17 種酸水解影響較小的胺基酸種類，各處理之胺基酸含量如表 8，17 種胺基酸含量中皆以對照組高於配方 2 及配方 3。

討論

替代能源使用後產生的資源物利用，一直是替代能源是否可以推廣的主要限制因子之一。本研究為去化替代能源使用後的資源物，遂結合沼氣發電後的沼渣與生產蔗糖後的蔗渣等 2 種物質，測試於菇類栽培應用的前景。試驗中發現沼渣的組成分包含部分未完全分解的有機物和微生物共同組成，因此富含有機質、腐植酸、氮、磷及鉀等營養元素。過去文獻提及以禽畜排泄物或蔗渣等農業廢棄物經厭氧發酵產生沼氣時，廢棄物中的氮素源、半纖維素會被厭氧發酵菌分解，產生氨氣、甲烷、二氧化碳等經過分解的小分子碳、氮素源，並留下較難分解的纖維素及木質素 (Banik & Nandi 2000, 2004; Gupta *et al*. 2016)。

沼渣在農田可作為土壤改良劑，有效改善土壤理化性質，並提高土壤中有機質含量，增強土壤保肥功能和緩衝能力等功效，因此最常作為土壤添加劑使用。但是，也由於在規模化禽畜飼養過程中，為加快其生長速度，常在飼料中添加大量之銅、鋅、鐵及砷等元素，藉以提高飼料利用率與防治禽畜疾病，然禽畜對於

圖 4. 以沼渣與蔗渣取代米糠後對杏鮑菇太空包出菇之影響。圖為刺激後不同天數比較。(A) 配方 1-對照組，15 d；(B) 配方 2，14 d；(C) 配方 3，14 d；(D) 比較 3 種配方間菇體形狀，由左到右分別為配方 1 到 3。各配方如下，配方 1：木屑 60% + 米糠 30% + 粉頭 10%；配方 2：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 15% + 蔗渣 5%；配方 3：木屑 60% + 米糠 10% + 粉頭 10% + 沼渣 10% + 蔗渣 10%。

Fig. 4. Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue and bagasse on the yield of *Pleuotus eryngii*. Different days after the stimulation of fruiting: (A) Treatment 1 (check), 15 d; (B) Treatment 2, after 14 d; (C) Treatment 3, after 14 d; and (D) comparison of mushroom shape of *P. eryngii* among three treatments, from left to right were Treatment 1 to Treatment 3. Treatment 1: 60% sawdust with 30% rice bran and 10% wheat middlings; Treatment 2: 60% sawdust with 10% rice bran, 10% wheat middlings, 15% biogas residue and 5% bagasse; and Treatment 3: 60% sawdust with 10% rice bran, 10% wheat middlings, 10% biogas residue and 10% bagasse.

表 7. 以沼渣與蔗渣取代米糠後對杏鮑菇主要養分與重金屬含量之影響。

Table 7. Effects of replacement of rice bran with various percentages of biogas residue and bagasse on the content of major nutrients and heavy metals in *Pleurotus eryngii*.

	Element present							
	Percent (w/w)				Heavy metal (mg L^{-1})			
Treatment	Protein	Lipid	Water	Ash	Pb	Cd	Cu	Zn
Treatment 1 - check[z]	2.6	0.4	86.6	0.6	ND[y]	0.2	5.59	45.3
Treatment 2 - 15% biogas residue + 5% bagasse	2.1	0.2	87.6	0.5	ND	0.1	3.14	48.7
Treatment 3 - 10% biogas residue + 10% bagasse	2.0	0.3	87.9	0.5	ND	0.1	2.67	33.9

[z] Treatment 1: 60% sawdust + 30% rice bran + 10% wheat middlings; Treatment 2: 60 % sawdust + 10% rice bran + 10% wheat middlings + 15% biogas residue + 5% bagasse; and Treatment 3: 60% sawdust + 10% rice bran + 10% wheat middlings + 10% biogas residue + 10% bagasse.

[y] ND: not detected.

表 8. 用沼渣與蔗渣取代米糠後對杏鮑菇菇體胺基酸含量之影響。

Table 8. Amino acid composition of *Pleurotus eryngii* fruit bodies harvested from growth media replacement of rice brain with various percentages of biogas residue and bagasse.

		20% Rice bran replaced with	
Amino acid (μg g^{-1})	Treatment 1 - control[z]	Treatment 2 - 15% biogas residue + 5% bagasse	Treatment 3 - 10% biogas residue + 10% bagasse
Aspartic acid	1,868.10	1,332.80	1,269.40
Glutamic acid	2,865.00	1,970.10	1,818.40
Serine	1,142.30	867.07	790.27
Histidine[z]	502.94	382.98	376.65
Glycine	1,160.60	815.42	782.02
Threonine[z]	1,101.80	805.55	756.13
Arginine	1,909.60	1,700.70	1,426.10
Alanine	1,936.60	1,588.10	1,469.90
Tyrosine	625.99	440.53	415.46
Cysteine	1,875.80	1,625.00	1,510.40
Valine[z]	1,215.30	865.04	820.10
Methionine[z]	30.36	ND[y]	ND
Phenylalanine[z]	994.65	707.36	658.96
Isoleucine[z]	927.83	644.68	614.56
Leucine[z]	1,569.90	1,094.00	1,051.70
Lysine[z]	1,406.70	893.03	853.04
Proline	1,006.50	714.25	664.54

[z] Essential amino acids.
[y] ND: not detected.

重金屬利用率較低，因此多數重金屬元素皆會隨糞便排出體外，也因此沼渣中多半含有大量之重金屬而限制使用於土壤的數量 (Zhang *et al*. 2016)。近年來各國為有效利用沼渣，因此開始多方研究，除應用於製作堆肥、土壤添加劑、害蚊忌避劑外 (Ashwath *et al*. 2016)，其中最廣泛應用即是在菇類栽培上之研究。目前已有報告指出，沼渣可應用於平菇、洋菇、金針菇、杏鮑菇、黃白側耳、雞腿菇、草菇與銀耳等食用菌上 (Gou *et al*. 2007; Cao *et al*. 2008; Yu *et al*. 2012, 2014; Wei *et al*. 2017)。

本研究測試 3 個添加沼渣與蔗渣處理組之走菌速度，皆優於單純使用米糠之對照組，其中杏鮑菇菌株在配方 3 可獲得最佳之走菌速度。此外，若以菌絲緻密度一併觀察，則仍以配方 3 為最佳配方。試驗以配方 3 為基礎進行太空包配方設計，並進行相關太空包製作及走菌栽培試驗，試驗結果亦顯示利用沼渣與蔗渣取代米糠可有效提升走菌之速度，且對於菇體之產量有穩定提升。因此，試驗顯示沼渣與蔗渣混和之配方，確實具有取代米糠成為輔料功能之潛力。

Ashwath *et al*. (2016) 的研究證實澆灌含有小分子碳、氮、磷素源的沼液，相較於水處理組能提升 *Pleurotus florida* 平均產量達 66%，並且在菇體、廢棄栽培介質中皆能檢測沼液處理組比起水對照組含有更高的碳、氮、磷源含量。蔗渣含有纖維素 32–48%、半纖維素 19–24%、木質素 23–32% 及戊糖、己糖等單雙糖分子 (Zhou *et al*. 2004)，經過發酵堆積轉化後，纖維素等大分子碳源會被部分轉化為粗蛋白，被食用菌作為菌絲生長的養分利用 (Okano *et al*. 2007)，進一步提升食用菌菌絲生長速度 (MiKi *et al*. 2005)。因為沼渣與蔗渣含有這些經初步分解、便於利用的小分子養分，可說明本試驗中添加沼渣與蔗渣確實可以

提升杏鮑菇菌絲走菌速度與出菇產量。

多數菇類發現於栽培介質中額外添加沼渣可以提升菇體蛋白質含量，Banik & Nandi (2000) 將草菇介質調整稻草與牛糞沼渣比為 1：2，發現比起純稻草可以提升 23.4% 總蛋白質含量。其在 2004 年試驗發現，秀珍菇上利用稻草添加 50% 混合沼渣之堆肥 (jute caddies)，可較純稻草配方提升菇體粗蛋白質量達 57% (Banik & Nandi 2004)。Gupta *et al*. (2016) 亦發現在麥桿上添加 20% 長葉馬府油樹與牛糞製作成之沼渣，能提高秀珍菇體總胺基酸達 23%，惟本研究卻發現添加沼渣組在粗蛋白量及 17 種胺基酸含量皆低於對照組。推測原因可能如下：(1) 本研究所用豬糞尿沼渣與國外牛糞沼渣成分差異。牛糞在半纖維素、纖維素及木質素等碳源含量高於我國現行豬糞尿資材 (Lay *et al*. 2012)，而因纖維素含量較高分解較慢，厭氧發酵後仍剩餘較多食用菌可利用的纖維素、木質素 (Ashwath *et al*. 2016)，豬糞尿則為高氮源、纖維素及低木質素 (Lay *et al*. 2012)。(2) 杏鮑菇對氮源利用偏好性之差異。蠔菇屬 (*Pleurotus*) 菇類對氮源之利用效率分別為：麩胺酸 > 煙胺根離子 > 亞硝酸根離子 > 硝酸根離子，這些小分子氮源在產沼氣初期即被厭氧發酵使用完畢，導致後續杏鮑菇出菇時無法直接使用，需隨時間經過分解介質並轉化吸收方能在菌絲內累積氮源養分 (Bellettini *et al*. 2016)。

Wei *et al*. (2017) 的研究指出，氮源總量固定的條件下，提高栽培介質之碳氮比，可減緩碳源不足導致之菌絲弱化及代謝產物缺乏，進而提升銀耳產能。本研究使用含碳素源含量較少之豬糞尿沼渣作為沼渣來源，但介質中亦添加蔗渣補充碳素源，故此種養分差異導致本研究中杏鮑菇產量雖有提升，但內部胺基酸與蛋白質含量卻沒有如同其他報告出現增加趨勢。

在目前之研究中，亦發現利用沼渣與蔗渣取代米糠之介質配方中，常有太空包在栽培過程中出現太空包塑膠包體與介質產生空隙，因而在太空包內產生次生菇體之情形。此現象可能來自於沼渣與蔗渣顆粒較細小，因此當栽培過程中水分喪失後，導致太空包出現凹陷區域使次生菇體形成。未來如要避免此一現象，可考慮添加保水性較高之玉米芯，或是先將太空包整體含水量在不影響菌絲呼吸、出菇之前提下調高，以避免因為脫水出現縫隙產生次生菇體導致菇體整體產量下降之情形。

本研究透過木屑太空包法驗證，發現以沼渣與蔗渣取代米糠確實可提升杏鮑菇之走菌速度與產量。試驗中為確保運用沼渣栽培後之菇體重金屬安全，模擬菇類栽培業者管理模式，將菇體送往經 TFDA 及 TAF 驗證之分析檢驗公司進行重金屬含量分析，結果顯示杏鮑菇菇體不會吸附重金屬鉛，且對於鎘、銅、鋅之吸附能力較低。此結果類似於國外相關報導，指出杏鮑菇對重金屬 (如鎘與鉛) 吸附能力較低 (Xu *et al*. 2005)。目前我國衛生福利部訂定之食品中汙染物質及毒素衛生標準法規中，針對菇蕈類規定之重金屬限制僅有鉛與鎘，其濃度分別為 2 與 3 ppm，而針對錫、砷、銻及銅等則未有規定。本試驗結果顯示，利用沼渣所栽培之杏鮑菇菇體，符合目前衛生福利部對菇蕈重金屬殘留量的規定。然而，試驗結果亦顯示對照組菇體所含之銅濃度高於處理組 (表 6)。由米糠、粉頭、沼渣等資材銅含量之分析結果，發現兩者之銅含量皆低於沼渣 (表 1)，且文獻中亦無杏鮑菇吸附銅之機轉機制，因此推測除了介質原始銅含量外，仍有其他因素會影響杏鮑菇菇體吸附銅之能力。因此，未來對於杏鮑菇吸附銅之能力是否與使用之資材特性有關，值得後續進一步進行探討。本試驗目前篩選出之沼渣最適配方不僅可取代米糠，且具有提升杏鮑菇走菌速度與提升杏鮑菇產量之效果，故未來可成為沼渣與蔗渣去化與提升這些資源物附加價值利用之重要方式。

引用文獻

Ashwath, R., H. N. Chanakya, and S. Malayil. 2016. Utilization of biogas digester liquid for higher mushroom yeilds. Procedia Environ. Sci. 35:781–784. doi:10.1016/j.proenv.2016.07.093

Banik, S. and R. Nandi. 2000. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of *Volvariella*

volvacea mushroom. J. Sci. Ind. Res. 59:407–412.

Banik, S. and R. Nandi. 2004. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom. Ind. Crop Prod. 20:311–319. doi:10.1016/j.indcrop.2003.11.003

Bellettini, M. B., F. A. Fiorda, H. A. Maieves, G. L. Teixeira, S. Ávila, P. S. Hornung, A. M. Júnior, and R. H. Ribani. 2016. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. Saudi J. Biol. Sci. 26:633–646. doi:10.1016/j.sjbs.2016.12.005

Cao, D. B., L. Yao, Y. Liu, G. L. Wang, Y. Q. Li, and L. S. Sun. 2008. Preliminary report on the cultivation of Coprinus comatus with biogas residue. Edible Fungi 30(5):29–30. (in Chinese) doi:10.3969/j.issn.1000-8357.2008.05.019

Gou, Y. P., Y. X. Chen, Y. Q. Wei, A. R. Pan, and R. J. Soug. 2007. Cultivating mushroom with biogas residue. China Biogas 25:33. (in Chinese) doi:10.3969/j.issn.1000-1166.2007.03.012

Gupta, A., S. Sharma, A. Kumar, P. Alam, and P. Ahmad. 2016. Enhancing nutritional contents of *Lentinus sajor-caju* using residual biogas slurry waste of detoxified mahua cake mixed with wheat straw. Front. Microbiol. 7:1529. doi:10.3389/fmicb.2016.01529

Lay, C. H., I. Y. Sung, K. Gopalakrishnan, C.Y. Chu, C. C. Chen, and C. Y. Lin. 2012. Optimizing biohydrogen production from mushroom cultivation waste using anaerobic mixed cultures. Intl. J. Hydrog. Energy 37:16473–16478. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.135

Lin, Y. W., T. S. Liu, H. Y. Guo, C. M. Chiang, H. J. Tang, H. T. Chen and J. H. Chen. 2015. Relationships between Cd concentrations in different vegetables and those in arable soils, and food safety evaluation of vegetables in Taiwan. Soil Sci. Plant Nutr. 61:983–998. doi:10.1080/00380768.2015.1078219

Lu, R. H. and H. M. Kong. 2017. Constraint effect of copper and zinc content on resource utilization of biogas slurry. J. Zhejiang Agric. Sci. 58:1638–1639. (in Chinese) doi:10.16178/j.issn.0528-9017.20170944

Miki, S., Y. Nimura, R. Kitao, and K. Okano. 2005. Effect of continued culture of spent corncob meal medium with *Pleurotus eryngii* on the nutrition value of the medium. Nihon Chikusan Gakka Anim. Sci. J. 76:309–314. (in Japanese with English abstract)

Okano, K., S. Fukui, R. Kitao, and T. Usagawa. 2007. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on *in vitro* digestibility and chemical composition. Anim. Feed Sci. Tech. 136:240–247. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.08.024

Wei, Q. S., J. Du, L. Wang, Y. Zhou, and H. J. Zhao. 2017. Effect on *Tremella fuciformis* growth and biological efficiency using straw biogas residue as a substitute for cottonseed hull in substrate formulae. Edible Fungi China 36:14–18. (in Chinese) doi:10.13629/j.cnki.53-1054.2017.01.004

Xu, L. H., Q. B. Chen, C. W. Ye, Y. M. Wu, and X. Li. 2005. Regularity of heavy metal absorption and accumulation in the cultivated fungi. J. AgroEnviron. Sci. 24:42–47. (in Chinese) doi:10.3321/j.issn:1672-2043.2005.z1.011

Yu, H. L., B. B. Lv, K. S. Li, H. Chen, J. X. Li, X. X. Zhang, X. D. Shang, and Q. Tan. 2012. Cultivation of *Flammulina velutipes* using biogas residue. Acta Edulis Fungi 19:41–43. (in Chinese)

Yu, H. L., B. B. Lv, Q. Tan, X. D. Shang, C. Y. Song, L. J. Zhang, M. Y. Zhang, and G. Li. 2014. Cultivation of *Pleurotus cornucopiae* using biogas production residue. Acta Edulis Fungi 21:25–28. (in Chinese)

Zhang, Y., Y. J. Liu, and Z. Jiang. 2016. Analysis of nutrient analysis and the feasibility of agricultural residue. J. Northeast Agric. Univ. 47:59–63. (in Chinese) doi:10.3969/j.issn.1005-9369.2016.03.009

Zhou, L., S. Y. Guo, and M. Y. Cai. 2004. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse. Sugar Crops China 2:40–42. (in Chinese) doi:10.3969/j.issn.1007-2624.2004.02.013

Effects of Biogas Residue and Bagasse on Mushroom Production

Chi-Yung Huang[1], Bee-Yu Wei[2], Hsiang-Cheng Hung[3], and Yun-Sheng Lu[1,*]

Abstract

Huang, C. Y., B. Y. Wei, H. C. Hung, and Y. S. Lu. 2020. Effects of biogas residue and bagasse on mushroom production. J. Taiwan Agric. Res. 69(3):193–206.

Energy shortage and over reliance on fossil fuels are important issues in Taiwan and the exploration of renewable energy is one way to solve the problem. Biogas energy is one type of the renewable energy, but the deployment of its uses is limited by the production of biogas residue. To solve this problem, biogas residue produced from fermentation of pig manure was mixed with bagasse in different ratios and put into mushroom sawdust bag with other ingredients for mushroom productions experiments in this study. The results showed that with part of rice bran replaced by the mixture of biogas residue and bagasse, the mycelium growth rate was increased in *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajor-caju*, *Hypsizygus marmoreus* and *Hypsizygus tessellatus* in the sawdust plate assay. With rice bran replaced with different amounts of the mitxure of biogas residue and bagasse in cultivation of *P. eryngii*, results showed that both the mycelium growth rate and yield of *P. eryngii* were increased. In the analyses of the heavy metal contents in the fruiting body of *P. eryngii*, no Pb was detected. However, Cd, Cu and Zn were detected in the fruiting body in lower concentrations. As a result, this study indicates that clean biogas residue and bagasse are potential materials used for mushroom production and biogas residue is considered an useful resource rather than no-use waste.

Key words: Biogas residue, Bagasse, *Pleurotus eryngii*, Circular agriculture.

Received: November 19, 2019; Accepted: May 6, 2020.
[*] Corresponding author, e-mail: yunsheng@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Plant Pathology Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Senior Researcher, Industrial Technology Research Institute, Material and Chemical Research Laboratories, Hsinchu, Taiwan, ROC.
[3] Associate Researcher, Industrial Technology Research Institute, Material and Chemical Research Laboratories, Hsinchu, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(3):207–217 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202009_69(3).0003 研究報告

紅龍果花期與幼果濕腐病 (病原 *Gilbertella persicaria*) 之藥劑篩選與田間防治

林筑蘋[1] 蔡志濃[2,*] 謝廷芳[3] 安寶貞[4]

摘要

林筑蘋、蔡志濃、謝廷芳、安寶貞。2020。紅龍果花期與幼果濕腐病 (病原 *Gilbertella persicaria*) 之藥劑篩選與田間防治。台灣農業研究 69(3):207–217。

紅龍果濕腐病由 *Gilbertella persicaria* 引起，可造成紅龍果 (*Hylocereus* spp.) 花苞與幼果腐敗，以及成熟果實在貯藏期腐爛，在台灣造成紅龍果產量巨大的損失，因此本研究目標為篩選此病害的防治藥劑。在培養基內測試 27 種化學合成藥劑與 10 種非化學合成藥劑對 *G. persicaria* 孢子發芽與菌絲生長的影響，結果顯示化學合成藥劑之中，賽普護汰寧對孢子發芽與菌絲生長、扶吉胺對孢子發芽之抑制效果最佳，1 mg a.i. L^{-1} 即有顯著效果；非化學合成藥劑中，以波爾多液 (石灰-硫酸銅合劑) 與『黑修羅』 (肉桂精油製劑) 在抑制孢子發芽與菌絲生長效果最佳，各別在 1-1 式與稀釋 10,000 倍時即有良好抑制效果。於紅龍果濕腐病好發季節以逢機完全區集設計進行田間防治試驗，於夏季開花期間噴布供試藥劑於白肉紅龍果 (*Hylocereus undatus*) 地上部。第一部田間試驗結果顯示，『黑修羅』與賽普護汰寧防治效果佳，可降低夏季紅龍果花期濕腐病，發病率分別為 14.2% ± 6.2% 與 14.5% ± 8.0%，與不施藥之對照組發病率 24.9% ± 7.0% 有顯著差異 ($P < 0.05$)。第二部田間試驗結果顯示，扶吉胺亦有防治效果，發病率為 11.8% ± 4.5%，與不施藥之對照組發病率 18.7% ± 1.3% 有顯著差異 ($P < 0.05$)。由上述試驗結果顯示，賽普護汰寧、扶吉胺及『黑修羅』均具有防治紅龍果花期濕腐病的效果。

關鍵詞：紅龍果花期濕腐病、藥劑防治、田間試驗。

前言

紅龍果又稱火龍果，英文名為 pitaya 或 dragon fruit，原產於中美洲地區，而目前台灣常見之栽培種類包括白肉種 (*Hylocereus undatus* Britt. & Rose) 與紅肉種 (*Hylocereus polyrhizus* Britt. & Rose; *Hylocereus costaricensis* Britt. & Rose) (Jiang & Yang 2015)，為台灣近年逐漸發展之重要熱帶果樹之一。夏季為紅龍果主要產季，自花苞冒出到盛開約需 14–20 d，平均為 17 d (Chang & Yen 1997)，開花僅 1 d，花瓣隨即凋謝，開花後約莫於 3 d 內子房逐漸膨大結果。一般民間栽培時，約於開花後 3–14 d 人工拔除花瓣與柱頭；果實約於開花後 4–5 wk 轉色、成熟並採收。

紅龍果濕腐病是台灣目前田間最嚴重的病害之一，係由 *Gilbertella persicaria* (E. D. Eddy) Hesselt 引起 (Lin *et al*. 2014)，可感染花器造成花苞水浸狀腐爛而折損，或影響授粉造成結果不良。剛授粉完成之初結幼果，常因病原菌感染花器，病原菌由柱頭或花瓣尾端入侵，再影響幼果前端之果皮與果肉，形成幼果褐化腐

投稿日期：2020 年 4 月 6 日；接受日期：2020 年 5 月 15 日。
[*] 通訊作者：TsaiJN@tari.gov.tw
[1] 行政院農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 行政院農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[3] 行政院農委會農業試驗所植物病理組研究員兼組長。台灣 台中市。
[4] 行政院農委會農業試驗所植物病理組退休研究員。台灣 台中市。

爛，造成紅龍果花期與幼果濕腐病。值得一提的是，目前田間觀察發現，除以上因花器感染影響而出現的病徵之外，授粉成功之幼果不會再受到進一步感染，往後各發育時期之果實亦未發現過罹染濕腐病。待果實成熟轉色後，採收果則可再次見到果實罹染濕腐病，於切口或鱗片周圍出現水浸狀病斑，引起紅龍果採後濕腐病。綜合上述，紅龍果濕腐病病徵發展快速，紅龍果花期與幼果濕腐病在短期內造成田間大量花苞與初期幼果折損；若未妥善防治，後續有機會經由傷口伺機再感染成熟果實，發展成紅龍果採後濕腐病，造成更嚴重之產量損失。

除 *G. persicaria* 引起之濕腐病外，台灣紅龍果病害有正式報導者尚有 *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers 引起之紅龍果潰瘍病 (Chuang *et al*. 2012)、*Colletotrichum* spp. 引起之炭疽病 (Lin *et al*. 2017) 以及 *Bipolaris cactivora* (Petr.) Alcorn 引起之果腐病 (Wang & Lin 2005)。而植物保護手冊 (現已更名為植物保護資訊系統；https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm) 僅針對紅龍果炭疽病提供推薦用藥，計有三氟敏、亞托待克利、甲基多保淨 (thiophanate-methyl)、百克敏、克熱淨 (iminoctadine tris)、得克利 (tebuconazole)、免得爛 (mitram)、賽普護汰寧、亞托敏等，而後於 2017 年、2018 年陸續增加三氟派瑞 (fluopyram + trifloxystrobin)、扶吉胺等藥劑，共 11 種紅龍果合法用藥。依照『殺菌劑抗藥性行動委員會』 (Fungicide Resistance Action Committee; FRAC; https://www.frac.info) 分類，這些藥劑之作用機制多元，值得探討與其他作用機制之化學合成藥劑輪替防治紅龍果濕腐病之可能性。

行政院農業委員會農業試驗所開發多種植物萃取物或精油製劑產品，如沒食子酸水溶液-『活力能 (Active Power)』、香茅精油微乳劑-『銹躲 (Rust Escape)』、『黴挫 (Mold Stop)』，以及肉桂精油微乳劑-『炭無蹤 (Anthracnose Escape)』、『黑修羅 (Black Asura)』等，此類非化學合成藥劑具有抑制病原菌孢子發芽或 (和) 菌絲生長等功效，具抑制紅龍果病害之潛力。

目前對紅龍果濕腐病尚無正式藥劑可供病害防治參考，本研究進行室內培養基與田間試驗，測試化學合成藥劑與非化學合成藥劑對紅龍果花期濕腐病防治效果，期可提供防疫單位及農友在選擇藥劑防治時之參考。

材料與方法

供試菌株來源、培養與保存

本研究測試之濕腐病菌菌株為 F210187 與 F212122 共 2 菌株，各別分離自台中市場白肉紅龍果與南投縣中寮鄉紅肉紅龍果幼果果實，經比對內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer) 與形態鑑定皆為 *G. persicaria*。菌株分離與保存方式見 Lin *et al*. (2014) 之方法。

供試藥劑之培養基配置

馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar; PDA; BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 在高溫高壓滅菌後，待冷卻至 55–60℃時加入不同測試藥劑。化學合成藥劑類者，使其最終有效成分 (active ingredient; a.i.) 濃度為 1 mg a.i. L^{-1}、10 mg a.i. L^{-1}、100 mg a.i. L^{-1}，FRAC 分類與藥劑名稱如下：FRAC 1 (B1) 類，有 41.8% 腐絕 (thiabendazole) 水懸劑 (suspension concentrates; SC) (興農股份有限公司，台灣台中市)、70% 甲基多保淨可濕性粉劑 (wetable powder; WP) (惠光化學股份有限公司，台灣台南市)；FRAC 2 (E3) 類，有 23.7% 依普同 (iprodione) SC (興農股份有限公司，台灣台中市)；FRAC 3 (G1) 類，有 25% 待克利 (difenoconazole) 乳劑 (emulsifiable concentrates; EC) (世大農化工廠股份有限公司，台灣桃園市)、25.9% 得克利水基乳劑 (emulsion, oil in water; EW) (台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、50% 撲克拉錳 (prochloraz-manganese) WP (台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 5 (G2) 類，有 84.2% 三得芬 (tridemorph) EC (雅飛有限公司，台灣台北市)；FRAC 7 (C2) 類，有 75% 嘉保信 (oxycarboxin) WP (好速化學股份有限公司，台灣新竹市)；FRAC 7 (C2) 複合 FRAC 11 (C3) 類，有 50% 三氟派瑞 SC (台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 9 (D1) 類，有 50% 賽普洛 (cyprodinil) 水分散

性粒劑 (water dispersible granules; WG) (台灣先正達股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 9 (D1) 複合 FRAC 12 (E2) 類，有 61.25% 賽普護汰寧 (cyprodinil + fludioxonil) WG (台灣先正達股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 11 (C3) 類，有 10% 亞托敏 (azoxystrobin) SC (台灣先正達股份有限公司，台灣台北市)、50% 三氟敏 (trifloxystrobin) WG (台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、23.6% 百克敏 (pyraclostrobin) EC (台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 11 (C3) 複合 FRAC 7 (C2) 類，有 38% 白列克敏 (pyraclostrobin + boscalid) WG (台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 11 (C3) 複合 FRAC 3 (G1) 類，有 32.5% 亞托待克利 (azoxystrobin + difenoconazole) SC (台灣先正達股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 12 (E2) 類，有 35% 依得利 (etridiazole) WP (大勝化學工業股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 16.1 (I1) 類，有 75% 三賽唑 (tricyclazole) WP (台灣道禮股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 20 (B4) 類，有 23.2% 賓克隆 (pencycuron) SC (維丰國際股份有限公司，台灣新北市)；FRAC 24 (D3) 複合 FRAC M1 類，有 81.3% 嘉賜銅 (kasugamycin + copper oxychloride) WP (世大農化工廠股份有限公司，台灣桃園市)；FRAC 28 (F4) 類，有 66.5% 普拔克 (propamocarb hydrochloride) 溶液 (soluble concentrates; SL) (台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 29 (C5) 類，有 39.5% 扶吉胺 (fluazinam) SC (亞中實業股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 30 (A3) 類，有 30% 殺紋寧 (hymexazol) SL (大勝化學工業股份有限公司，台灣台北市)；FRAC 40 (H5) 類，有 50% 達滅芬 (dimethomorph) WP (興農股份有限公司，台灣台中市)；FRAC 43 (B5) 複合 FRAC 28 (F4) 類，有 60.8% 氟比拔克 (fluopicolide + propamocarb hydrochloride) SC (台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)；FRAC M3 類，有 80% 免得爛 WG (台灣巴斯夫股份有限公司，台灣台北市)；FRAC M7 類，有 40% 克熱淨 WP (億豐農化廠股份有限公司，台灣台中市) 等，共計 22 類 27 種藥劑。

非化學合成藥劑類者，名稱與最終藥劑濃度如下：波爾多液 [$Ca(OH)_2$, $CuSO_4$, Sigma, St. Louis, MO, USA] 最終濃度為 1-1、2-2、4-4 式；氯化鈣 ($CaCl_2$, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)、碳酸氫鈉 ($NaHCO_3$, 沛鑫生物科技有限公司，台灣台中市) 與亞磷酸中和液 (H_3PO_3：KOH = 1：1；H_3PO_3, KOH, Sigma, St. Louis, MO, USA) 等為 10 mg a.i. L^{-1}、100 mg a.i. L^{-1}、1,000 mg a.i. L^{-1}；石灰硫磺合劑 (消石灰：硫磺：水 = 1 : 2 : 10) (消石灰，頂峰企業股份有限公司，台灣新竹市；硫磺，榮茂興業股份有限公司，台灣高雄市；逆滲透水)、2.5% 沒食子酸水溶液-商品名『活力能』(Active Power，農業試驗所專利配方)、20% 香茅精油微乳劑 1-商品名『銹躲』 (Rust Escape，農業試驗所配方)、10% 香茅精油微乳劑 2-商品名『黴挫』 (Mold Stop，農業試驗所配方)、36% 肉桂精油微乳劑 1-商品名『黑修羅』 (Black Asura，農業試驗所配方)、40% 肉桂精油微乳劑 2-商品名『炭無蹤』 (Anthracnose Escape，農業試驗所配方) 等製劑則為 10,000、5,000、1,000 稀釋倍率等，以上共 10 種非化學合成藥劑。

藥劑對分離株菌絲生長與孢子發芽抑制測試

孢子發芽抑制測試方面

供試菌株為 F210187 與 F212122，皆各別培養與測試。菌株以 24℃避光培養於 PDA 培養基上 3 d，以無菌水洗下孢子後再以高溫高壓滅菌過之 8 層紗布過濾，配製成 1–2 個孢囊孢子 μL^{-1} 懸浮液，取 10 μL 滴置於在含藥劑或對照組之培養基上，12 滴/皿，共 3 皿，避光培養於 32℃。於 24 h 後，最終各處理組逢機挑選 200 顆孢子記錄孢子發芽狀況，孢子發芽管長度超過孢子半徑即標記為發芽。孢子發芽抑制率 = (對照組發芽率 – 處理組發芽率)/(對照組發芽率) × 100%。

菌絲生長抑制測試方面

供試菌株為 F210187 與 F212122，皆各別培養與測試。菌株先培養在 PDA 上，避光

培養於 24–32℃ 24 h 後，以無菌之打孔器 (孔徑 5 mm) 切取菌落前緣，菌絲面朝下移植於含藥劑之培養基，避光培養於 24℃。由於菌株 24℃下於 3 d 內即長滿直徑 9 cm 之培養基，因此，每皿每日生長速率 = (生長滿 2 d 之菌落半徑 – 生長滿 1 d 之菌落半徑)/(2 d – 1 d) × 100%。菌絲生長抑制率 = (對照組每日生長速率 – 處理組每日生長速率)/(對照組生長速率) × 100%。

供試菌株各自測試 2 次，各菌株對藥劑之反應有些微差異，本試驗為求得藥劑對病原菌族群之抑制率，以藥劑對菌株抑制率之平均值表示。將 2 供試菌株之 2 次數值，共 4 組資料，平均之，即得到藥劑對 *G. persicaria* 之孢子發芽或菌絲生長「平均抑制率」，以 mean ± standard error 表示。

田間藥劑試驗設計

田間試驗於台中市外埔區紅龍果產銷班一農戶之白肉紅龍果田內進行，採逢機完全區集設計 (random complete block design; RCBD) 規劃試區，並施藥實測藥劑對紅龍果濕腐病的防治效果。2017 年施用藥劑，包括賽普護汰寧 (62.5% 水分散粒劑，稀釋 2,000×，w/v)、肉桂精油微乳劑『黑修羅』 (稀釋 1,000×，v/v) 並以施用地下水作為不防治的對照，共 3 組。田間每 10 支石柱之紅龍果為一組，施用一藥劑，組與組間隔 4 石柱作為緩衝行，以人工背桶施用藥劑。本年度共重複獨立測試 3 次試驗 (第一次：7 月 5 日至 10 日開花，7 月 10 日施藥，7 月 12 日調查數據；第二次：7 月 22 日至 26 日開花，7 月 24 日施藥，8 月 1 日調查數據；第三次：8 月 30 日至 9 月 3 日開花，8 月 27 日施藥，惟因遭逢大雨而於 9 月 1 日補施藥一次，9 月 6 日調查數據)，處理組位置在每次試驗中以逢機方式決定，單一次試驗視為逢機完全區集設計內的一區集進行統計分析，共 3 區集。2018 年以 RCBD 方式進行測試，在田區挑選 4 小區，每區集間設計有緩衝行，處理組於區集內之位置採逢機方式決定，區分為賽普護汰寧 (62.5% 水分散粒劑，稀釋 2,000×，w/v)、扶吉胺 (39.5% SC，稀釋 2,000×，v/v)、地下水等，共 3 處理組。同樣係每 10 支石柱之紅龍果為一組，藥劑僅施用石柱之左側植株，避免交叉污染隔壁組；區集間間隔 4 支石柱作為緩衝行。田區多數花於 7 月 6 日至 11 日開花，分別於 7 月 6 日、13 日施用藥劑，7 月 21 日調查數據。另重複本試驗，該場次多數花於 2018 年 8 月 11 日至 14 日開花，分別於 8 月 13 日、16 日及 18 日施用藥劑，8 月 28 日調查數據。罹病率計算公式：(濕腐病之花苞與幼果累計量/處理組花苞與幼果總數) × 100%。

統計分析

以 SAS Enterprise Guide 7.1 版進行單因子 RCBD 試驗之變方分析與最小顯著差異性測試 (least significance difference test; LSD test)。

結果

化學合成藥劑對 *G. persicaria* 孢子發芽與菌絲生長之影響

藥劑試驗皆選擇 *G. persicaria* 菌株 F210187 與 F212122 作為供試菌株，化學合成藥劑之供試藥劑對 2 菌株孢子發芽與菌絲生長的平均抑制效果，如圖 1 所示。

抑制孢子發芽方面

在 1 mg a.i. L^{-1} 下，抑制效果最佳為 FRAC 29 (C5) 類之扶吉胺，抑制率可達 100.0% ± 0.0%，以及複合藥劑賽普護汰寧 [FRAC 9 (D1) + FRAC 12 (E2)]，為 91.5% ± 3.7%；當藥劑濃度提高至 10 mg a.i. L^{-1} 時，有效藥劑新增 FRAC 3 (G1) 類之待克利、得克利和撲克拉錳、FRAC M3 類之免得爛，以及 FRAC 11 (C3) 類之百克敏，抑制率分別為 96.0% ± 2.4%、98.8% ± 1.3%、86.0% ± 5.5%、90.6% ± 9.3% 以及 70.5% ± 12.1%；藥劑濃度 100 mg a.i. L^{-1} 時，有效藥劑再增加 FRAC 2, E3 依普同、FRAC 5, G2 三得芬及 FRAC 14, F3 依得利等，抑制率皆提高至 100.0%。

抑制菌絲生長方面

1 mg a.i. L^{-1} 下，以賽普護汰寧抑制率為 100.0% 效果最佳；10 mg a.i. L^{-1} 時，新增 FRAC 2,

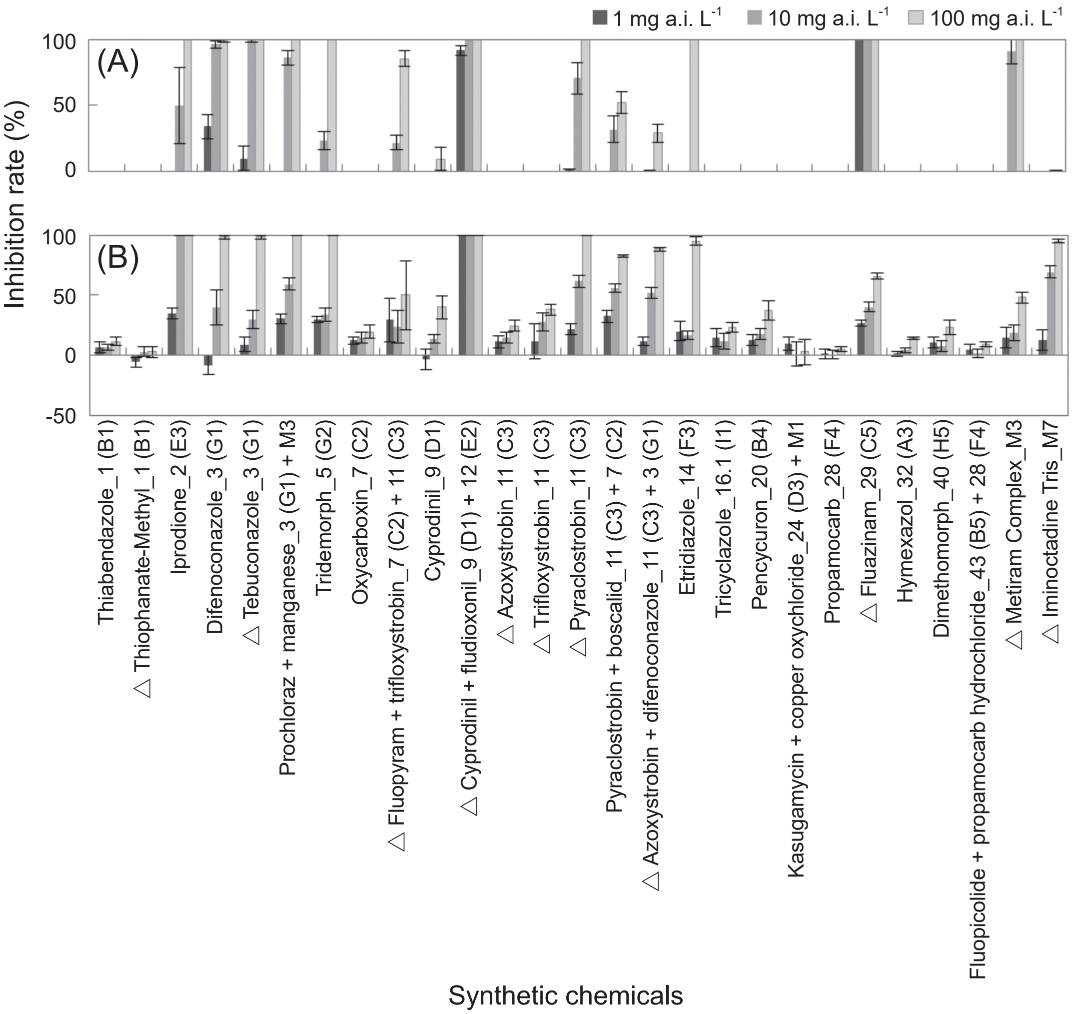

圖 1. 化學合成藥劑對 *Gilbertella persicaria* 菌株 F210187 與 F212122 (A) 孢子發芽與 (B) 菌絲生長之平均抑制率。

Fig. 1. Efficacy of synthetic chemicals in different concentrations on inhibition of (A) spore germination and (B) hyphae growth of *Gilbertella persicaria* isolates. The means shown here were the averaged values of the inhibition rates of the chemicals against F210187 and F212122 isolates. Chemicals name followed Fungicide Resistance Action Committee Mode of Action Code (FRAC MoA Code) numbers. Spore germination (SG) inhibition rate at 24 h post inoculation = (SG rate of treatment – SG rate of CK)/(SG rate of CK) × 100%; hyphae growth (HG) inhibition rate = (HG rate of treatment – HG rate of control)/HG rate of control × 100%; HG rate = [diam. 2 d post inoculation (dpi) – diam. 1 dpi]/(2 – 1) × 100%; and CK: distilled water instead of tested chemicals in potato dextrose agar. This experiment was conducted more than 2 times with 200 sporangial spores or 3 replicates of each isolate for each time (Bar = standard error; △: authorized fungicides of pitaya disease in Taiwan).

E3 依普同與 FRAC M7 克熱淨，抑制率各別提高至 100.0% 與 69.3% ± 5.2%，FRAC 11, C3 類亦僅百克敏達 59.3% ± 1.1%，FRAC 3, G1 類撲克拉錳 59.3% ± 5.3%。另外，複合藥劑白列克敏 (FRAC 11, C3 + 7, C2) 與亞托待克利 (FRAC 11, C3 + 3, G1) 亦達 56.3% ± 3.4% 與 52.0% ± 4.8%；濃度提高至 100 mg a.i. L^{-1} 時，再增加 FRAC 5, G2 三得芬與及 FRAC 3, G1 類的待克利與得克利，抑制率各別為 99.8% ± 0.3%、98.3% ± 1.4% 及 98.3% ± 1.8%。此外，FRAC 14, F3 依得利，達 94.8% ± 3.5%，最後為 FRAC 29, C5 之扶吉胺，達 66.8% ± 2.5%。

其餘供試藥劑，無論在何種測試濃度下，對 *G. persicaria* 之孢子發芽與菌絲生長抑制率皆低於 50%。

非化學合成藥劑對 *G. persicaria* 孢子發芽與菌絲生長的影響

非化學合成藥劑選擇礦物鹽類、植物萃取液及植物精油製劑等，其對 *G. persicaria* 抑制效果，如圖 2 所示。

抑制孢子發芽率方面

礦物鹽中，僅少部分抑制率高於 50%，其中波爾多液之抑制率佳，1-1 式為 50.5% ± 3.5%，抑制效果隨濃度提高而增加，4-4 式下為 100.0%。而亞磷酸中和液與石灰硫磺合劑，則是各別在 1,000 mg a.i. L^{-1} 與稀釋 1,000× 時才有抑制效果，達 100.0% 與 57.3% ± 5.8%；植物精油萃取液產品中，肉桂精油微乳劑 1『黑修羅』與微乳劑 2『炭無蹤』對孢子發芽之抑制效果佳，在產品稀釋 10,000× 下抑制率各別為 58.7% ± 8.0% 與 66.3% ± 0.0%，在產品稀釋 5,000× 時抑制率高達 100% 與 83.3% ± 16.7%。

抑制菌絲生長方面

礦物鹽中，僅波爾多液有較佳的抑制效果，1-1 式抑制率即有 96.7% ± 1.3%，2-2 式

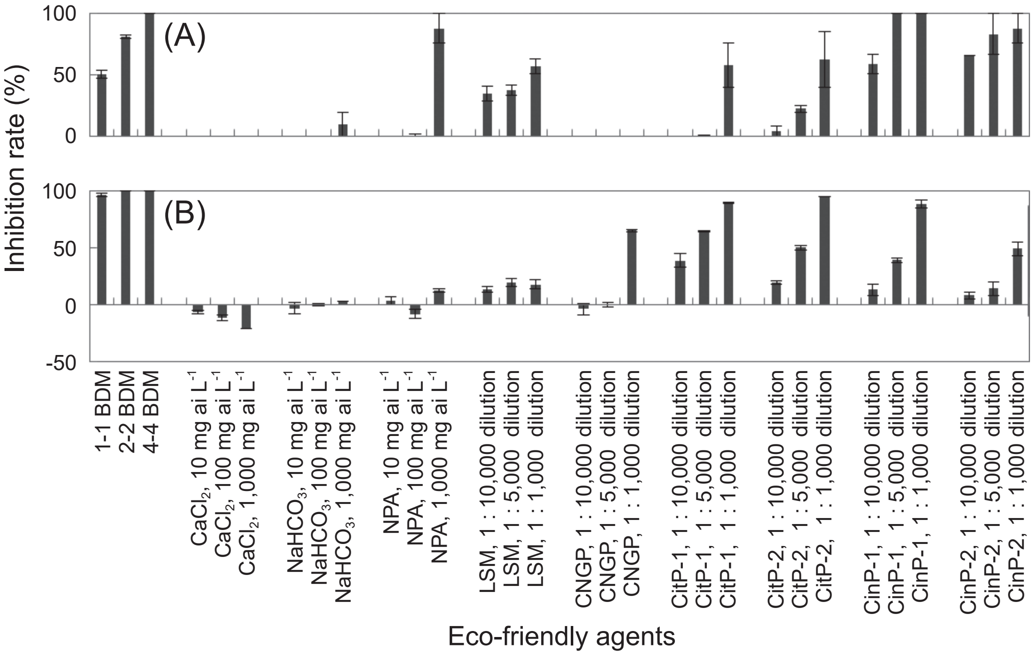

圖 2.　非化學合成藥劑對 *Gilbertella persicaria* 菌株 F210187 與 F212122 (A) 孢子發芽與 (B) 菌絲生長之平均抑制率。BDM：波爾多液；NPA：亞磷酸中和液；LSM：石灰硫磺合劑；CNG (『活力能』，農業試驗所專利配方)：2.5% 沒食子酸水溶液；Cit-1 (『銹躲』，農業試驗所專利配方)：20% 香茅精油微乳劑 1；Cit-2 (『黴挫』，農業試驗所專利配方)：10% 香茅精油微乳劑 2；Cin-1 (『黑修羅』，農業試驗所專利配方)：36% 肉桂精油微乳劑 1；Cin-2 (『炭無蹤』，農業試驗所專利配方)：40% 肉桂精油微乳劑 2。

Fig. 2.　Effect of non-chemical materials on inhibition of (A) spore germination and (B) hyphae growth of *Gilbertella persicaria* isolates. The means shown here were the averaged values of the inhibition rates of the agents against F210187 and F212122 isolates. This experiment was conducted more than 2 times with 200 sporangial spores or 3 replicates of each isolate for each time [BDM: bordeaux mixture; NPA: neutralized phosphoric acid; LSM: line sulfur mixture; CNG (Active Power, TARI): 2.5% gallic acid, chinese nut-gall extract product; Cit-1 (Rust Escape, TARI): 20% citronella extract oil product 1; Cit-2 (Mold Stop, TARI): 10% citronella extract oil product 2; Cin-1 (Black Asura, TARI): 36% cinnamon extract oil microemulsifier 1; and Cin-2 (Anthracnose Escape, TARI): 40% cinnamon extract oil microemulsifier 2] (Bar = standard error).

及 4-4 式抑制率皆為 100%。植物精油萃取液產品中，產品稀釋 5,000× 下，以香茅精油微乳劑 1『銹躲』與 2『黴挫』之效果最佳，抑制率分別達 65.0% ± 0.3% 與 50.6% ± 1.9%；產品稀釋 1,000× 下，再增肉桂精油微乳劑 1『黑修羅』，抑制率達 89.1% ± 3.3%。其餘之供測藥劑在測試濃度下對菌絲生長之抑制率皆低於 50%。

田間測試藥劑之防治效果

為測試供試藥劑防治紅龍果花期及幼果濕腐病的效果，田間試驗分 2 年進行。第一年 (2017 年) 選定對孢子發芽與菌絲生長有較高抑制效果的合成藥劑賽普護汰寧，與非合成藥劑『黑修羅』，於紅龍果濕腐病好發季節前往台中市外埔區白肉紅龍果果園測試藥劑田間的防病效果。雖然培養基結果顯示，波爾多液對孢子與菌絲抑制效果皆佳，但因施用波爾多液後的藍色藥斑會殘存在後續生長出的幼果表面，故田間測試以不影響果實外觀品質之『黑修羅』為優先。本試驗於 2017 年獨立測試共 3 次，每次於田區逢機規劃 3 組處理地下水、賽普護汰寧或『黑修羅』，施藥原則為開花後施用一次，若間隔 7 d 內遇下雨則補噴藥 1 次。每次試驗視下雨狀況施用 1–2 次藥劑，並於開花算起 2–3 wk 後 (此時約已結果 1–2 wk) 計算受到 *G. persicaria* 感染而汰除的花苞與幼果比例，將此 3 次試驗視為 RCBD 內的 3 區集檢視各處理的罹病率。試驗結果顯示 (圖 3)，對照組平均罹病率為 24.9% ± 7.0%，施用賽普護汰寧與『黑修羅』後，罹病率降為 14.2% ± 6.2% 與 14.5% ± 8.0%，與對照組相比具顯著差異 ($P < 0.05$)，防治率分別達 49.1% ± 13.2% 與 47.5% ± 15.6%，而 2 藥劑間無顯著差異 ($P > 0.05$)。

第二年 (2018 年) 田間試驗方面，選取在培養基試驗中抑制菌絲生長效果不高，但抑制孢子發芽效果為所有供試藥劑中最高的扶吉胺，測試其田間對紅龍果花期及幼果濕腐病防治效果，並以賽普護汰寧與地下水各作為正與負對照藥劑。試驗時，以 RCBD 設計方式於紅龍果田內挑選 4 小區，每小區內各自規劃 3 處理組。本年度第 1 場施藥時機，為紅龍果花開當天與摘除幼果殘餘花瓣 (約間隔 7 d) 各施用 1 次藥劑，共施藥 2 次。試驗結果如圖 4 所示，對照組 4 區平均的花期與幼果濕腐病罹染率為 18.7% ± 1.3%，而施用扶吉胺與正對照組賽普護汰寧的罹病率分別為 11.8% ± 4.5% 與 11.1% ± 2.3%，與對照組成顯著差異 ($P < 0.05$)，平均防治率各達 41.6% ± 9.0% 與 39.8% ± 20.9%。而 2 處理藥劑之防治率相似，無顯著差異 ($P > 0.05$)。本試驗另再進行第 2 場重複測試，試驗結果與前述相似，水、扶吉胺與賽普護汰寧的罹病率分別為 22.4% ± 3.0%、8.7% ± 2.6% 與 11.0% ± 2.0%，確定扶吉胺與賽普護汰寧可顯著降低發病率。

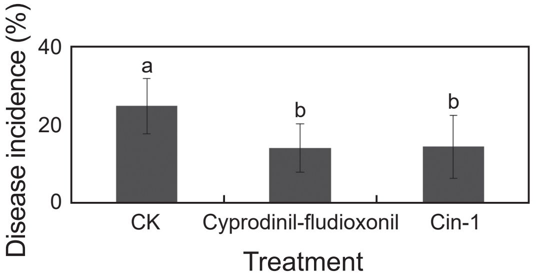

圖 3. 施用賽普護汰寧或肉桂精油製劑 1『黑修羅』(Cin-1) 後對紅龍果花期濕腐病罹病率之影響。

Fig. 3. Effect of cyprodinil-fludioxonil mixture and cinnamon essential oil product (Black Asura) on disease incidence of pitaya flower wet rot caused by *Gilbertella persicaria* in the field. This experiment was conducted 3 times and placed in a random complete block design (RCBD) in the summer of 2017. Columns with the same letters are not significantly different based on the least significant different (LSD) test ($P < 0.05$) [CK: negative control, sprayed with water instead of chemicals or agents; cyprodinil-fludioxonil mixture (62.5%, water dispersible granules), 1 : 2,000 dilution; Cin-1 (Black Asura, TARI): 36% cinnamon essential oil microemulsifier 1, 1 : 1,000 dilution] (Bar = standard error).

討論

造成紅龍果花期與幼果嚴重損失的濕腐病係由 *G. persicaria* 引起，目前植物保護資訊系統 (https://otserv2.tactri.gov.tw/ppm) 尚未針對紅龍果濕腐病提供推薦用藥，僅表列紅龍果炭疽病的 11 種用藥。雖然這些藥劑不是直接推薦用在紅龍果濕腐病，但係紅龍果合法用藥，因此若能從中找到可同時抑制 *G. persicaria* 之

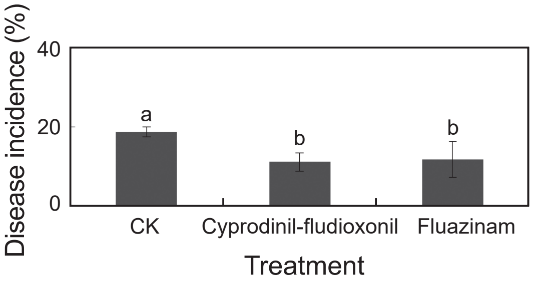

圖 4. 施用扶吉胺對紅龍果花期濕腐病罹病率之影響。

Fig. 4. Effect of the fluazinam, with highly inhibitory ability against *Gilbertella persicaria* spore germination, on disease incidence of pitaya flower wet rot caused by *G. persicaria* in the field. This experiment was tested in a random complete block design with 4 blocks (replicates) in the summer of 2018. Columns with the same letters are not significantly different based on the least significant difference (LSD) test ($P < 0.05$) [Cyprodinil-fludioxonil mixture (62.5% water dispersible granules) as positive control, 1 : 2,000 dilution; CK: negative control, sprayed with water; fluazinam (39.5%, suspension concentrates), 1 : 2,000 dilution] (Bar = standard error).

藥劑，便可延伸使用在紅龍果濕腐病的防治上。另為探索其他藥劑抑制 *G. persicaria* 潛力，本試驗亦按照 FRAC 標準測試部分「其他不同作用機制之化學合成藥劑」，並且也選用多種非化學合成藥劑等，各別測試對其孢子發芽與菌絲生長之抑制效果，希冀從中篩選出具潛力的藥劑。

化學合成藥劑方面 (圖 1)，以賽普護汰寧抑制效果最佳，在 1 mg a.i. L^{-1} 下即可同時高度抑制 *G. persicaria* 孢子發芽與菌絲生長；非化學合成藥劑方面 (圖 2)，波爾多液以及肉桂精油微乳劑『黑修羅』可同時抑制孢子發芽與菌絲生長，具防治潛力。然而，施用波爾多液後會殘留少許之藍色硫酸銅與石灰錯合物藥斑，在後續成熟果表面，造成收成果外觀品質不佳。因此，田間防治效果測試以賽普護汰寧與『黑修羅』為優先。田間防治測試結果顯示 (圖 3)，在紅龍果濕腐病好發季節，於開花期各別施用 1–2 次賽普護汰寧或『黑修羅』，皆可有效降低因感染 *G. persicaria* 造成之花苞與初期幼果折損率，平均防治率將近 5 成，防治效果顯著。*G. persicaria* 除感染花苞外，亦會感染成熟果實，在開花時期施用藥劑是否也能降低後續採收後果實罹病率值得再探討。

扶吉胺雖然抑制 *G. persicaria* 菌絲生長的效果普通，必須至 100 mg a.i. L^{-1} 才有稍高於 50% 之抑制率，然其 1 mg ai L^{-1} 下抑制孢子發芽的效果強，數據顯示為所有供試藥劑中最佳者。根據觀察與推測，紅龍果花期與幼果濕腐病的發生係由於開花時受到大量 *G. persicaria* 孢子傳播與發芽入侵，進而造成花器嚴重感染，若能抑制孢子發芽對於防治花期濕腐病可能有所助益。因此，本研究特別於 2018 年測試扶吉胺田間實際防治效果。結果顯示 (圖 4)，扶吉胺的防治效果與賽普護汰寧防治效果相似，表示抑制 *G. persicaria* 孢子發芽確實為防治紅龍果花期濕腐病的重要關鍵之一。賽普護汰寧為賽普洛與護汰寧之複合藥劑，作用機制分類為 FRAC 9 (D1) 複合 FRAC 12 (E2) 類，而扶吉胺屬 FRAC 29 (C5) 類，雖然未實際測試賽普護汰寧加上扶吉胺是否具加乘效果，但因兩藥劑之作用機制不同，複合使用時病害也不容易產生抗藥性，建議可直接在田間搭配使用防治紅龍果濕腐病。

在未顯示資料中，2017 年田間防治測試中曾遇過一極端狀況，即施藥後遇連續大雨，造成藥劑包括賽普護汰寧以及『黑修羅』防治效果不顯著。因此，在 2018 年賽普護汰寧與扶吉胺防治比較試驗中，施藥時機調整為開花後 1 次，7 d 後果實約結果 1 wk 後再噴 1 次，這間隔期間若遇下雨則立即再補充 1 次藥劑。另外，在未顯示的資料中，施藥後若遇下雨，則扶吉胺、賽普護汰寧及『黑修羅』防治 *G. persicara* 效果降低，尤其以『黑修羅』容易受影響。推論雨水可能會沖刷掉藥劑，或者雨勢有助 *G. persicaria* 侵染花器，進而降低藥劑之防治效果。綜合以上，藥劑最佳的使用條件仍有待進一步測試，目前已知下雨過後應儘速再補充噴施藥劑，以增加防治紅龍果花期與幼果濕腐病效果。

其他具抑制 *G. persicaria* 潛力的合成藥劑方面，本次 FRAC 11 (C3) 類選擇 3 個藥劑，其中僅百克敏在 10 mg a.i. L^{-1} 對孢子發芽與菌絲生長抑制率表現佳；屬於 FRAC 3 (G1)

類之待克利、得克利及撲克拉錳 (複合藥劑 prochloraz + manganese，其中後者為 FRAC M3 類)，以及屬於 FRAC 2 (E3) 類之依普同對孢子發芽抑制率在 10 mg a.i. L^{-1} 時提高，這些藥劑對菌絲生長抑制率到 100 mg a.i. L^{-1} 下抑制率可高於 50%；屬於 FRAC 14 (F3) 之依得利與FRAC 5 (G3) 之三得芬在100 mg a.i. L^{-1} 對孢子與菌絲抑制率高 (圖 1)。這些有抑制 *G. persicaria* 孢子發芽與菌絲生長能力之藥劑具防治紅龍果濕腐病潛力，且因為各藥劑間作用機制分類屬性不同，有利於輪替使用。

非化學合成藥劑方面，2 種香茅精油製劑、2 種肉桂精油製劑以及亞磷酸中和液等，對孢子發芽與菌絲生長有一定抑制效果 (圖 2)。根據 Lai (2017) 報告，肉桂、丁香、百里香、檸檬草及香茅油精油對 *G. persicaria* 具有抑制孢子與菌絲生長效果，其中以肉桂精油效果最佳。本研究中製劑 1『黑修羅』及製劑 2『炭無蹤』之肉桂精油成分各 36% 及 40%，然培養基測試結果顯示以黑修羅抑制 *G. persicaria* 菌絲生長能力較高，同時田間初步試驗『黑修羅』防治濕腐病效果較『炭無蹤』明顯 (未顯示之資料)。因此，推論『黑修羅』成分內除了肉桂精油外，可能還有其他可抑制 *G. persicaria* 之有效成分。『黑修羅』目前已技術轉移廠商製造生產，而動植物防疫檢疫局預行公告肉桂油納作免登記植物資材清單，相信很快即可正式對外銷售，可提供農民作為一般慣行農藥以外的選擇。亞磷酸中和液為多種病害之有效藥劑 (Ann *et al*. 2009)，高濃度下可直接抑制部分卵菌生長 (Fenn & Coffey 1984; Cerqueira *et al*. 2017)，但主要作用機制為間接引發植物防禦反應而達到防治病害之效果 (Jackson *et al*. 2000; Machinandiarena *et al*. 2012; Lim *et al*. 2013)。亞磷酸在紅龍果花期或採收後直接抑制 *G. persicaria* 之防治效果，有待未來進一步測試。

目前已篩選出可用於田間防治由 *G. persicaria* 引起之紅龍果花期與幼果濕腐病之化學合成藥劑，包括賽普護汰寧及扶吉胺，非化學合成藥劑則有肉桂精油微乳劑『黑修羅』。*G. persicaria* 除造成紅龍果花期與幼果濕腐病外，還會導致成熟果實腐爛，為果實採收後最重要病害之一 (Lin *et al*. 2014)。果實採收後的藥劑使用安全性常被高度關注，若使用化學合成藥劑容易造成食安問題，而毒性較低且安全的鹽類或精油製劑相對較無安全疑慮。可直接抑制 *G. persicaria* 孢子發芽或菌絲生長之非化學合成藥劑，包括香茅精油製劑及肉桂精油製劑等，未來能否用於防治採收後紅龍果濕腐病，值得進一步評估。

誌謝

本研究承蒙行政院農業委員會科技計畫 105 農科-10.5.1-農-C1(5)、106 農科-9.5.1-農-C1(4)、107 農科-8.4.1-農-C1(7)、108 農科-8.4.1-農-C1(7) 計畫經費支持，更依賴多位研究助理，依年代順序為徐子惠、陳品儒、黃麟婷、柯妍伶、林依佳等，以及當時暑期實習生賴柏羽 (台灣大學植物醫學學程) 共同協助完成，謹此致謝。

引用文獻

Ann, P. J., J. N. Tsai, I. T. Wong, T. F. Hsieh, and C. Y. Lin. 2009. A simple technique, concentration and application schedule for using neutralized phosphorous acid to control phytophthora diseases. Plant Pathol. Bull. 18:155–165.

Cerqueira, A., A. Alves, H. Berenguer, B. Correia, A. Gomez-Cadenas, J. J. Diez, P. Monteiro, and G. Pinto. 2017. Phosphite shifts physiological and hormonal profile of Monterey pine and delays *Fusarium circinatum* progression. Plant Physiol. Biochem. 114:88–99. doi:10.1016/j.plaphy.2017.02.020

Chang, F. R. and C. R. Yen. 1997. Flowering and fruit growth of pitaya (*Hylocereus undatus* Britt. & Rise). J. Chinese Soc. Hort. Sci. 43:314–321. (in Chinese with English abstract) doi:10.6964/JCSHS.199712.0314

Chuang, M. F., H. F. Ni, H. R. Yang, S. L. Shu, S. Y. Lai, and Y. L. Jiang. 2012. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. Plant Dis. 96:906. doi:10.1094/PDIS-08-11-0689-PDN

Fenn, M. E. and M. D. Coffey. 1984. Studies on the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. Phytopathology 74:606–611.

Jackson, T. J., T. Burgess, I. Colquhoun, and G. E. S. Hardy. 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathol. 49:147–154. doi:10.1046/j.1365-3059.2000.00422.x

Jiang, Y. L. and W. J. Yang. 2015. The effects of heavy shading and flowering thinning in summer on off-season production in red pitaya (*Hylocereus* sp.). J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 61:69–77. (in Chinese with English abstract)

Lai, P. Y. 2017. The efficacy of combined application of essential oils and coating materials in controlling post-harvest diseases of pitaya. Master thesis, Master Program for Plant Medicine, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 134 pp. (in Chinese with English abstract) doi:10.6342/NTU201702377

Lim, S., T. Borza, R. D. Peters, R. H. Coffin, K. I. Al-Mughrabi, D. M. Pinto, and G. Wang-Pruski. 2013. Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. J. Proteomics 93:207–223. doi:10.1016/j.jprot.2013.03.010

Lin, C. P., P. J. Ann, H. C. Huang, J. T. Chang, and J. N. Tsai. 2017. Anthracnose of pitaya (*Hylocereus* spp.) caused by *Colletotrichum* spp., a new postharvest disease in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 66:171–183. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06603.01

Lin, J. P., P. J. Ann, J. N. Tsai, Z. H. Hsu, and J. T. Chang. 2014. Flower and fruit wet rot of pitaya (*Hylocereus* spp.) caused by *Gilbertella persicaria*, a new disease record in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23:109–124. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.201406_23(2).0003

Machinandiarena, M. F., M. C. Lobato, M. L. Feldman, G. R. Daleo, and A. B. Andreu. 2012. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. J. Plant Physiol. 169:1417–1424. doi:10.1016/j.jplph.2012.05.005

Wang, C. L. and C. C. Lin. 2005. Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14:269–274. (in Chinese with English abstract) doi:10.6649/PPB.200512_14(4).0007

Chemical Screening and Field Trials for Controlling Pitaya Flower Wet Rot Caused by *Gilbertella persicaria*

Chu-Ping Lin[1], Jyh-Nong Tsai[2,*], Ting-Fang Hsieh[3], and Pao-Jen Ann[4]

Abstract

Lin, C. P., J. N. Tsai, T. F. Hsieh, and P. J. Ann. 2020. Chemical screening and field trials for controlling pitaya flower wet rot caused by *Gilbertella persicaria*. J. Taiwan Agric. Res. 69(3):207–217.

Pitaya Gilbertella rot, also called pitaya wet rot, is caused by *Gilbertella persicaria*. The pathogen not only damages the flowers and early fruit of pitaya (*Hylocereus* spp.) but also causes rot on mature fruit during storage. Because the disease has led to a huge amount of yield loss of pitaya in Taiwan, the objective of this study was to screen chemicals or eco-friendly agents for controlling this disease. A total of 27 synthetic chemicals and 10 eco-friendly agents were tested *in vitro* for the inhibition effect of mycelial growth and spore germination of *G. persicaria*. The results showed that among the tested synthetic chemicals, cyprodinil-fludioxonil mixture was the most effective chemical in inhibiting both spore germination and mycelial growth of the pathogen, and fluaziname was the best in inhibiting spore germination. As for eco-friendly agents, Black Asura (microemulsifier of cinnamon essential oil) and bordeaux mixture (mixture of lime and copper sulfate) were the most effective materials. Two field trials of disease control were conducted in a randomized complete block design in the summer of 2017 and 2018. In each experiment, the chemicals were sprayed 1–2 times on shoots and flowers of pitaya (*Hylocereus undatus*) during each flowering period. In 2017 field trial, the treatment of Black Asura and cyprodinil-fludioxonil mixture significantly lowered disease incidence of pitaya flower and young fruit wet rot (14.2% ± 6.2% and 14.5% ± 8.0%, respectively) when compared with the control (24.9% ± 7.0%) ($P < 0.05$). In 2018 field trial, the treatment of cyprodinil-fludioxonil mixture, as well as fluaziname, also showed effective in disease control (11.1% ± 2.3% and 11.8% ± 4.5%, respectively) when compared with the control (18.7% ± 1.3%) ($P < 0.05$). The above test results revealed that cyprodinil-fludioxonil mixture, fluaziname, and Black Asura are potential chemicals for the control of pitaya flower and young fruit wet rot in field.

Key words: Pitaya flower wet rot, Chemical control, Field trial.

Received: April 6, 2020; Accepted: May 15, 2020.

* Corresponding author, e-mail: TsaiJN@tari.gov.tw

1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

2 Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

3 Research Fellow and Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

4 Former Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(3):218–226 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202009_69(3).0004

研究報告

溫度對青翅蟻形隱翅蟲 (*Paederus fuscipes* Curtis) 發育與繁殖之影響

黃守宏[1]　鄭清煥[2]　陳柏宏[3,*]

摘要

黃守宏、鄭清煥、陳柏宏。2020。溫度對青翅蟻形隱翅蟲 (*Paederus fuscipes* Curtis) 發育與繁殖之影響。台灣農業研究 69(3):218–226。

青翅蟻形隱翅蟲 (*Paederus fuscipes* Curtis) 屬捕食性昆蟲，為水稻害蟲重要天敵種類之一。本研究於 15、20、25 及 30℃之 4 個定溫環境下進行，測得卵、幼蟲及蛹期於 30℃下最短之發育時間，分別為 3.6、11.6 及 3.0 d；發育臨界溫度分別為 8.8、9.4 及 12.3℃；完成各發育期之有效積溫分別為 73.4、232.6 及 53.8 日度。以 25℃下雌成蟲產卵量最多，一生平均可產 190.8 粒卵，平均每日產卵量以 25℃及 30℃最高，分別為 2.2 粒及 2.4 粒卵。幼蟲期及雄成蟲之總取食量皆以 25℃下為最高，幼蟲期總取食為 37.6 隻 1 齡褐飛蝨若蟲，雄成蟲總取食為 202.2 隻 3 齡褐飛蝨若蟲；雌成蟲則以 25℃及 20℃下之總取食量最高，分別為 279.8 隻及 257.2 隻 3 齡褐飛蝨若蟲。依據本研究結果推論，環境溫度約於 25–30℃的範圍下，較適合台灣地區青翅蟻形隱翅蟲族群之發育及繁殖。

關鍵詞：青翅蟻形隱翅蟲、溫度、發育、繁殖。

前言

青翅蟻形隱翅蟲 (rove beetle, *Paederus fuscipes* Curtis) 屬於鞘翅目 (Coleoptera) 隱翅蟲科 (Staphylinidae)，地理分布範圍廣，以熱帶及亞熱帶地區之溫暖潮濕環境為主要棲息場所 (Frank & Kanamitsu 1987; Bong *et al*. 2012)。由於該蟲具趨光性，而時常侵入人類居所，蟲體一旦遭受拍打、擠壓或破裂，其體液內屬於發皰物質 (vesicant properties) 的隱翅蟲素 (pederin) 會引發人體皮膚發炎、潰爛，於許多地區皆曾有隱翅蟲族群大規模發生，而威脅人類居家安全之紀錄 (Armstrong & Winfield 1969; Wang *et al*. 1969; Frank & Kanamitsu 1987; Borroni *et al*. 1991; Huang *et al*. 2009; Bong *et al*. 2013, 2015)。因此，該蟲於醫學上被視為重要衛生害蟲之一 (Frank & Kanamitsu 1987)。

另一方面，青翅蟻形隱翅蟲由於會捕食水稻、小麥、玉米及棉花等作物上的多種害蟲，因此亦是重要的天敵昆蟲之一 (Chien *et al*. 1984; de Kraker *et al*. 2000; Devi *et al*. 2003; Chatzimanolis *et al*. 2004; Thorbek & Bilde 2004)。在多種水稻害蟲中，青翅蟻形隱翅蟲偏好以褐飛蝨 [*Nilaparvata lugens* (Stål)] 若蟲 (Padmavathi *et al*. 2008) 為食，故此蟲為抑制褐飛蝨田間族群的重要因子 (Chu & Hirashima 1981; Ooi & Shepard 1994; Padmavathi *et al*. 2008)。褐飛蝨為南亞及東南亞的水稻關鍵害蟲 (Cheng 1990; Dale 1994; Huang *et al*. 2010)。在台灣，褐飛蝨於水稻各期作內能繁殖 3–4 個世代，以往曾記錄於二期作導致 10–

投稿日期：2020 年 3 月 6 日；接受日期：2020 年 5 月 22 日。
[*] 通訊作者：chenph@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義分所植物保護系副研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義分所植物保護系前研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

100% (平均約 30%) 的水稻產量損失 (Cheng 1976)，近年來台灣各地區亦時有較嚴重的蝨燒情形發生 (未發表資料)。

青翅蟻形隱翅蟲在台灣可週年生長與繁殖，常棲息於水稻本田及周遭區域，一般於水稻生育初期即可發現其蹤跡，於水稻生育中、末期達到族群高峰 (Chu & Hirashima 1981)。然而，台灣水稻不同期作的環境溫度差異頗大，以嘉義地區為例 (1981–2010 年)，1–3 月 (一期作種植期間) 的月均溫度為 16.5–19.7℃ (最低均溫為 12.5–15.9℃)，7–9 月 (二期作種植期間) 的月均溫為 27.0–28.6℃ (最高均溫為 31.6–33.1℃) (交通部中央氣象局，https://www.cwb.gov.tw/V7/climate/monthlyMean/Taiwan_tx.htm)。因此，在水稻栽培環境變動甚鉅的情況下，青翅蟻形隱翅蟲於生態上的生存、發育及繁殖策略，為天敵防治上相當重要的研究議題。

一般而言，生物在變動的環境中，特別於溫度及相對濕度 (relative humidity; RH) 此兩非生物性因子作用之情況下，對生物之發育、存活、族群豐度及生殖能力等，皆會造成直接或間接性的影響，而生物亦具有調整及適應環境之策略 (Wagner *et al*. 1984; Logan *et al*. 1985; Lysyk 1998; Wermelinger & Seifert 1999; Bale *et al*. 2002; Powell & Logan 2005; Tsai & Chi 2007; Eliopoulos *et al*. 2010; Huang *et al*. 2010; Régnière *et al*. 2012; Bong *et al*. 2013)。惟迄今，僅有少數研究探討溫度對青翅蟻形隱翅蟲族群發育與消長之影響 (Bong *et al*. 2012, 2013)。本研究目的為探討青翅蟻形隱翅蟲在不同定溫下之發育及繁殖等生物學資訊，試圖瞭解在台灣一、二期水稻栽培期間的環境溫度變化下，隱翅蟲可能表現之生物特性的變化，藉此作為未來於生物防治應用之參考。

材料與方法

供試蟲源

試驗用蟲為青翅蟻形隱翅蟲，初始族群採集自行政院農業委員會農業試驗所之嘉義農業試驗分所溪口農場水稻田 (嘉義縣溪口鄉)，飼養於塑膠養蟲箱 (30 cm × 30 cm × 30 cm)，養蟲箱則置於生長箱內，生長箱溫度為 28℃ ± 2℃，相對濕度 70% ± 5%，光照明 (L) 暗 (D) 週期為 12 h 明期及 12 h 暗期 (12 L : 12 D)。養蟲箱內放置約 3.2 g 棉花並添加約 22 mL 純水，以提供蟲體水分來源及成蟲產卵場所，食物來源為室外網籠累代飼養之褐飛蝨若蟲。青翅蟻形隱翅蟲先經室內飼育至少 1 世代後，再進行下述不同定溫處理試驗。

溫度對青翅蟻形隱翅蟲未成熟蟲期發育及取食能力之影響

試驗於 4 個定溫 (15、20、25 及 30℃) 設定的定溫箱中進行，明暗週期 12 L : 12 D。受測卵、幼蟲及成蟲分別飼養於培養皿 (直徑 9.0 cm，高 1.5 cm) 內，皿底鋪設 1 張濾紙 (直徑 9.0 cm)，另放置 1 塊濕棉花以保持濕度。

卵期調查方式如下：將甫產下之蟲卵置於培養皿中，每皿放置 6–8 粒蟲卵，每一溫度處理 5 重複 (皿)。每日觀察並記錄孵化之卵數，直至無卵粒孵化為止，以此測得不同定溫處理下卵的平均孵化率及發育時間。

幼蟲期生活史及取食量之調查方式如下：將單隻甫孵化的 1 齡隱翅蟲幼蟲置於培養皿中飼養，每一溫度處理 20 重複 (皿)。皿內固定放入 10 隻 1 齡褐飛蝨若蟲活體作為食餌，並每日更換褐飛蝨。每日觀察並記錄幼蟲各齡期發育所需時間及褐飛蝨數量，直至幼蟲化蛹並羽化成蟲為止，以此測得各齡期於不同定溫下平均發育速率 (developmental rate) 及取食量。

溫度對青翅蟻形隱翅蟲成蟲壽命及取食量之影響

試驗於 4 個定溫 (15、20、25 及 30℃) 設定的定溫箱中進行，將甫羽化之雌、雄成蟲單隻飼養於培養皿中，皿內每日放入 10 隻 3 齡褐飛蝨若蟲活體作為食餌，且每日更換褐飛蝨，每一定溫處理下雌、雄成蟲各 15–25 重複 (皿)。其餘各項環境及飼養條件，皆同未成熟蟲期試驗段落所述。每日觀察並記錄雌、雄成蟲壽命及褐飛蝨取食量。由於雄成蟲於 15℃及 20℃下死亡率甚高，故不列入紀錄與分析。

溫度對青翅蟻形隱翅蟲雌成蟲產卵量之影響

試驗於 4 個定溫 (15、20、25 及 30℃) 設定的定溫箱中進行，將單對甫羽化之雌、雄成蟲置於培養皿中飼養，每處理 (溫度) 20–25 重複 (皿)。皿內放入足量之 3 齡褐飛蝨若蟲活體作為食源，且每日定期補充。每日觀察並記錄雌成蟲產卵量。假若配對之雄成蟲死亡，則自飼養於相同溫度下的蟲源中選配一隻新的雄成蟲，確保雌成蟲成功受精以完成產卵調查試驗。由於雌成蟲於 15℃下之產卵量極低，故不列入紀錄與分析。

統計分析

各蟲期發育臨界溫度 (developmental threshold; *K*) 及有效積溫 (effective accumulated temperature; T_0)，求自直線回歸方程式 $Y = a + bT$ (Campbell *et al*. 1974; Sokal & Rohlf 1995)。其中，*Y* 為發育速率，係定溫下發育所需天數之倒數 (1/d)，*T* 則為飼養之定溫，進一步地透過 2 參數所求直線回歸方程式的斜率 (*b*) 及截距 (*a*)，則可算出發育臨界溫度 ($K = 1/b$) 及有效積溫 ($T_0 = -a/b$)。

各蟲期於不同定溫下之發育所需時間、取食量、成蟲壽命及雌成蟲產卵量數據，進行單因子變方分析 (one-way analysis of variance; one-way ANOVA)，若處理間存在顯著差異，則以最小顯著差異測驗法 (Fisher's least significant difference test; LSD test) 進行成對處理間比較。上述檢定之顯著水準設定為 0.05。試驗數據以 R version 3.4.3 分析。

結果

溫度對青翅蟻形隱翅蟲未成熟蟲期發育之影響

青翅蟻形隱翅蟲的卵、幼蟲及蛹於不同定溫下發育狀況與所需天數，如表 1 所示。卵孵化率於 15℃下約為 75%，於其餘溫度下則介於 87–94% 之間。各未成熟蟲期發育所需時間，呈現隨設定溫度上升而縮短之趨勢，且不同溫度下發育天數之間皆具顯著差異。4 個定溫環境中，以 15℃下的卵、幼蟲及蛹期發育所需時間最長，平均天數分別為 14.2、43.8 及 14.4 d，以 30℃下之發育時間最短，分別為 3.6、11.6 及 3.0 d。

各未成熟蟲期於 4 個定溫下之發育臨界溫度及有效積溫，如表 2 所示。卵、幼蟲及蛹期發育臨界溫度分別為 8.8、9.4 及 12.3℃，有效積溫分別為 73.4、232.6 及 53.8 日度，卵發育至蛹之發育臨界溫度為 10.1℃，有效積溫為 357.1 日度。

溫度對青翅蟻形隱翅蟲成蟲壽命之影響

雌、雄成蟲於 4 個定溫環境下的壽命，隨溫度上升而縮短。但於 15℃及 20℃之低溫環境下，雌、雄成蟲死亡率皆增加，其中雄成蟲因不易存活而無法有效量測實際壽命，雌成蟲存活個體則顯示具有較長壽命。雌成蟲於 15℃下的壽命最長，平均為 163.4 d，於 30℃下的壽命最短，僅 58.3 d，不同溫度下之壽命間皆具顯著差異；雄成蟲於 25℃下的壽命為 80.9 d，顯著較 30℃下的壽命長 (表 3)。

表 1. 青翅蟻型隱翅蟲於不同定溫下的卵孵化率及未成熟期平均發育時間。

Table 1. Effect of temperature on development of immature stages of *Paederus fuscipes*.

Temperature (℃)	Egg hatching rate (%)	Egg period (d) (mean ± SD)	Larval stage (d) (mean ± SD)			Pupal stage (d) (mean ± SD)
			1st instar	2nd instar	Total	
15	75.2 ± 7.9	14.2 ± 1.9 a[z]	18.7 ± 2.1	25.2 ± 2.5	43.8 ± 2.9 a	14.4 ± 1.7 a
20	87.3 ± 4.2	5.8 ± 1.3 b	8.3 ± 0.8	14.0 ± 1.3	22.3 ± 1.4 b	9.1 ± 1.3 b
25	94.1 ± 5.5	4.3 ± 0.6 c	4.1 ± 0.4	10.3 ± 0.5	14.4 ± 0.7 c	4.0 ± 0.3 c
30	94.4 ± 4.5	3.6 ± 0.5 d	3.2 ± 0.4	8.4 ± 0.8	11.6 ± 1.2 d	3.0 ± 0.0 d

[z] Means within a column followed by the same letter do not statistically differ by the least significant difference (LSD) test at the 5% level.

表 2. 青翅蟻形隱翅蟲各未成熟蟲期之發育臨界低溫及有效積溫。

Table 2. Threshold temperature of development and the sums of effective accumulated temperature of *Paederus fuscipes* based on the regression equations of velocity of development against temperature.

Stage	Simple linear regression model	R^2 value	Lower threshold of development temperature (℃)	Sums of effective temperature (day-degree)
Egg	y = 0.01363x – 0.11899	0.968	8.8	73.4
Larva	y = 0.00427x – 0.04040	0.994	9.4	232.6
Pupa	y = 0.01864x – 0.22863	0.963	12.3	53.8
Total	y = 0.00280x – 0.02818	0.993	10.1	357.1

表 3. 青翅蟻形隱翅蟲成蟲於不同定溫下之平均壽命及繁殖力。

Table 3. Longevity and fecundity of adult *Paederus fuscipes* at various temperatures.

Temperature (℃)	No. observed (male/female)	Longevity (d) (mean ± SD)		No. eggs laid per female (mean ± SD)	
		Male	Female	Total	Daily
15	-/25	-	163.4 ± 24.7 a	-	-
20	-/25	-	120.5 ± 47.7 b	102.0 ± 47.0 c[z]	0.9 ± 0.2 b
25	15/20	80.9 ± 6.7 a	80.9 ± 7.2 c	190.8 ± 28.1 a	2.4 ± 0.3 a
30	15/20	53.1 ± 12.2 b	58.3 ± 9.7 d	127.7 ± 26.5 b	2.2 ± 0.6 a

[z] Means within a column followed by the same letter do not statistically differ by the least significant difference (LSD) test at the 5% level.

溫度對青翅蟻形隱翅蟲雌成蟲產卵量之影響

關於雌成蟲於 4 個定溫環境下產卵量之變化，於 25℃下平均總產卵量為 190.8 粒，顯著多於 20℃與 30℃下之產卵量。每日產卵量則以 25℃及 30℃下顯著較多，平均為 2.2–2.4 粒卵，而於 20℃下的每日產卵量僅 0.9 粒卵 (表 3)。

溫度對青翅蟻形隱翅蟲取食量之影響

隱翅蟲幼、成蟲於 4 個定溫下取食褐飛蝨若蟲量，如表 4 所示。關於幼蟲期取食量，按所取食 1 齡褐飛蝨若蟲多寡，依序為 25℃ (37.6 隻)、20℃ (29.1 隻)、15℃ (24.6 隻) 及 30℃ (19.2 隻)，且各溫度取食量間皆具顯著差異。然而，不同定溫下的每日取食量間，則以 25℃下的每日取食量最多 (2.6 隻)，15℃下的取食量為 4 個定溫中最少 (0.5 隻)，呈現顯著差異。成蟲於 4 個定溫下的總取食量變化趨勢與幼蟲相似，雌、雄成蟲皆以 25℃下的 3 齡褐飛蝨若蟲取食量最多，兩者分別為 279.8 隻與 202.2 隻。另雌成蟲以 30℃下的取食量最少，為 169.4 隻。然而，雄成蟲於 30℃的每日取食量為 3.1 隻，較 25℃之取食量為多；雌成蟲的每日取食量則以 25℃下最多 (3.5 隻)，而後依序為 30℃ (2.9 隻)、20℃ (2.1 隻) 及 15℃ (1.1 隻)。此外，不同蟲期間的取食量亦有所差異，幼蟲期以 2 齡幼蟲的取食量較多，約為 1 齡幼蟲取食量的 2–3 倍。

討論

本研究於 25℃及 30℃下測得卵至幼蟲期的發育時間為 15.2–18.7 d，與 Bong *et al*. (2012) 於 28℃下之觀察結果 (17.4–18.7 d) 相似。在 4 個定溫的環境下，隱翅蟲未成熟蟲期發育時間隨溫度升高而減少，發育速率 (發育日數之倒數) 與溫度呈依變關係 (表 1)，而此現象亦存在於許多昆蟲中 (Logan *et al*. 1985; Atlihan & Chi 2008; Eliopoulos *et al*. 2010)。另一方面，隱翅蟲成蟲壽命與環境溫度的關係，亦呈現隨溫度升高而減少之趨勢，但雌、雄成蟲對於低溫度耐受程度卻有所差異，雄成蟲於 15℃及 20℃下存活率甚低，雌蟲部分卻得以存活且平均壽命達 120.5–163.4 d (表 3)。同屬的隱翅

表 4. 青翅蟻形隱翅蟲於不同定溫下之褐飛蝨若蟲取食量。

Table 4. Numbers of brown planthoppers consumed by *Paederus fuscipes* at various temperatures.

	BPH 1st star larvae consumed/larva				BPH 3rd instar larvae consumed/adult			
			Larval stage		Male		Female	
Temperature (℃)	1st instar	2nd instar	Total	Daily	Total	Daily	Total	Daily
15	8.3 ± 2.2	16.3 ± 3.9	24.6 ± 3.4 c[z]	0.5 ± 0.0 d[z]	-	-	180.1 ± 23.5 b	1.1 ± 0.1 d
20	8.9 ± 2.6	20.2 ± 6.0	29.1 ± 6.4 b	1.3 ± 0.1 c	-	-	257.2 ± 93.8 a	2.1 ± 0.4 c
25	10.4 ± 3.1	27.2 ± 5.9	37.6 ± 5.7 a	2.6 ± 0.4 a	202.2 ± 48.2 a	2.5 ± 0.6 b	279.8 ± 44.1 a	3.5 ± 0.4 a
30	4.7 ± 1.1	14.5 ± 2.2	19.2 ± 2.7 d	1.7 ± 0.2 b	166.7 ± 34.8 b	3.1 ± 0.4 a	169.4 ± 36.9 b	2.9 ± 0.2 b

[z] Means within a column followed by the same letter do not statistically differ by the least significant difference (LSD) test at the 5% level.

蟲 (*Paederus alfierii* Koch) 也具類似的溫度依變關係，Tawfik & Abouzeid (1977) 指出該種隱翅蟲之未成熟蟲期發育速率及成蟲壽命，與環境溫度呈現負相關。然而，環境溫度過高 (> 35℃) 對隱翅蟲亦具負面影響，可能導致幼、成蟲死亡率升高，且生殖力下降 (Bong *et al*. 2013)。

經由 4 個溫度下青翅蟻形隱翅蟲的發育時間，所得之卵、幼蟲及蛹期發育臨界溫度分別為 8.8、9.4 及 12.3℃，有效積溫分別為 73.4、232.6 及 53.8 日度 (表 2)。然而，Bong *et al*. (2013) 於馬來西亞所採集同種隱翅蟲之觀察結果與本研究略有差異，卵、幼蟲及蛹的發育臨界低溫分別為10.7、9.6 及 10.3℃；有效積溫分別為 83.3、194.6 (1、2 齡蟲分別為 75.5 日度與 119.1 日度) 及 54.1 日度。由於不同地區昆蟲族群，受環境因子 (例如，越冬與否、日照長度不同)、食物種類及人為因子 (藥劑施用) 等影響，其族群遺傳組成皆會有所改變 (Baldwin & Dingle 1986; Arnett & Gotelli 1999; Schmidt *et al*. 2005; Bong *et al*. 2012, 2014)，故本研究與 Bong *et al*. (2013) 分別自亞熱帶與熱帶地區採集之隱翅蟲個體，於生長發育的表現亦可能存在差異。

青翅蟻形隱翅蟲卵於 15℃下仍保有 75% 之高孵化率，且卵與幼蟲的發育臨界低溫約為 10℃ (表 2)，顯示隱翅蟲對於低溫具一定程度的耐受性，於溫度較低之冬季仍可存活及發育。因台灣平地於冬季 (12 月至翌年 2 月) 之月平均溫度多為 15℃以上 (交通部中央氣象局公開資料)，高於隱翅蟲未成熟蟲期的發育臨界低溫，顯示此蟲於台灣終年應可發育與繁殖，此亦與前人調查結果相吻合 (Chu & Hirashima 1981)。另透過該蟲卵發育至成蟲所需有效積溫 (357.1 日度)，按中央氣象局於 1981–2010 年調查之台灣各地月平均溫度，估計此蟲在台北、台中、嘉義及高雄 4 個地區，1 年分別可完成 13.2、13.5、13.3 及 15.4 個世代。

關於溫度對於青翅蟻形隱翅蟲成蟲壽命及繁殖力之影響，4 個溫度中，雌、雄蟲於 30℃下壽命最短 (分別為 58.3 d 及 53.1 d)，雌成蟲於 15℃下壽命為最長 (163.4 d)，雄蟲於 15 及 20℃下則呈高死亡率；產卵量上，於 25℃下的雌成蟲總產卵量及每日產卵量為最多，於 15℃下則無產卵。相似地，Bong *et al*. (2013) 的報告指出，熱帶地區之同種隱翅蟲個體，於 35℃或 15℃的環境下，雌、雄成蟲壽命皆相當短 (3.0–6.0 d)，死亡率亦相當高，於 23.5℃及 28℃下，平均壽命則為 51.3–64.7 d；產卵量上，以灰色庭蠊 [Lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* (Olivier)] 飼育之雌成蟲，於 23.5℃及 28℃分別可產下 77.8 粒及 127.3 粒卵，每日產卵量則分別為 1.5 粒及 2.4 粒，另於 15℃及 35℃下不產卵。此外，相較於本試驗結果，於雌成蟲產卵量上略有差異，此應與所提供之食物營養有關 (Joern & Behmer 1997; Bong *et al*. 2014)。另一方面，本研究結果顯示，當雌成蟲壽命因環境溫度上升而縮短，每日產卵量呈現增加之趨勢。根據 Polak & Starmer (1998)

於果蠅 (*Drosophila nigrospiracula* Patterson and Wheeler) 之研究，在壽命較短的情況下，果蠅雌成蟲會藉由提高生殖能力，以維持子代數量。事實上，此方式亦為多種昆蟲族群成功適應於不同環境棲所之策略 (Gadgil & Bossert 1970; Logan *et al*. 1985; Lysyk 1988; Wermelinger & Seifert 1999; Tsai & Chi 2007; Atilihan & Chi 2008; Eliopoulos *et al*. 2010; Hou & Weng 2010; Bong *et al*. 2012)。

捕食性昆蟲或蟎類之取食能力，通常隨著環境溫度上升而增加，但若超過一定之上限溫度則又會降低 (Pakyari & Enkegaard 2012; Fonseca *et al*. 2015; Helgadóttir *et al*. 2017)。本研究結果顯示，關於隱翅蟲幼、成蟲之取食能力，以成蟲的總取食量及每日取食量較高，於幼蟲期，又以 2 齡幼蟲取食量較 1 齡幼蟲高。於 4 個定溫中，幼蟲及雌成蟲又以 25℃下的取食能力最高，幼蟲每日取食量為 2.6 隻 1 齡飛蝨若蟲，雌成蟲每日取食量為 3.5 隻 3 齡飛蝨若蟲。雄成蟲則以 30℃下的每日取食量最高 (3.1 隻 3 齡飛蝨若蟲)，另以 25℃下的總取食量最高 (202.2 隻 3 齡飛蝨若蟲)。此外，於 15℃的低溫下，幼蟲及雌成蟲的取食能力皆相對較差。由此可知，於台灣所採集之青翅蟻形隱翅蟲，應以環境溫度約為 25℃之取食能力較強，但若溫度上升至 30℃以上，幼蟲及雌成蟲的取食量則會下降。

綜觀本試驗結果，青翅蟻形隱翅蟲於 25℃及 30℃的卵孵化率較高、發育較快、產卵量較高且取食飛蝨若蟲之能力亦較強，故相對溫暖之環境較適合此蟲生長發育及繁殖，國外相關研究報告亦呈相似之結論 (Manley 1977; Bong *et al*. 2012, 2013)。若以台灣各地區之月均溫為基準 (中央氣象局公開資料)，台灣北部 (台北) 以 5–9 月，中部 (台中與嘉義) 以 5–10 月，南部 (高雄) 以 4–10 月為最適合此蟲發育及繁殖之時期。然而，由於台灣之兩個水稻期作溫度變化相當大，溫差可達 18–20℃ (Cheng 1998)，青翅蟻形隱翅蟲在此劇烈變動之環境下，族群生存與發展勢必受到一定程度的衝擊，個體須在生態上有所調適以延續族群，如本研究顯示青翅蟻形隱翅蟲於低溫環境下的壽命較長，約為高溫環境下之 2.8 倍，此或許即係隱翅蟲渡過低溫環境的生存策略之一。此外，隨棲息地的環境變化，獵物的族群密度亦將隨之波動，而隱翅蟲個體及族群如何因應此變化，則有待進一步研究。

誌謝

本研究承蒙研究室同仁楊雪鳳、蕭繡琴、賴錦雲及黃瓊惠小姐等，辛勞的協助試驗調查等工作，在此一併致謝。

引用文獻

Armstrong, R. K. and J. L. Winfield. 1969. *Paederus fuscipes* dermatitis; an epidemic on Okinawa. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 18:147–150.

Arnett, A. E. and N. J. Gotelli. 1999. Geographic variation in life-history traits of the ant lion, *Myrmeleon immaculatus*: Evolutionary implications of Bergmann's rule. Evolution 53:1180–1188. doi:10.1111/j.1558-5646.1999.tb04531.x

Atlihan, R. and H. Chi. 2008. Temperature-dependent development and demography of *Scymnus subvillosus* (Coleoptera: Coccinellidae) reared on *Hyalopterus pruni* (Homoptera: Aphididae). J. Econ. Entomol. 101:325–333. doi:10.1093/jee/101.2.325

Baldwin, J. D. and H. Dingle. 1986. Geographic variation in the effects of temperature on life-history traits in the large milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. Oecologia 69:64–71. doi:10.1007/BF00399039

Bale, J. S., G. J. Masters, I. D. Hodkinson, C. Awmack, T. M. Bezemer, V. K. Brown, J. Butterfield, A. Buse, J. C. Coulson, J. Farrar, J. E. G. Good, R. Harrington, S. Hartley, T. H. Jones, R. L. Lindroth, M. C. Press, I. Symrnioudis, A. D. Watt, and J. B. Whittaker. 2002. Herbivory in global climate change research: Direct effects of rising temperature on insect herbivores. Glob. Change Biol. 8:1–16. doi:10.1046/j.1365-2486.2002.00451.x

Bong, L. J., K. B. Neoh, Z. Jaal, and C. Y. Lee. 2012. Life table of *Paederus fuscipes* (Coleoptera: Staphylinidae). J. Med. Entomol. 49:451–460. doi:10.1603/ME11163

Bong, L. J., K. B. Neoh, Z. Jaal, and C. Y. Lee. 2013. Influence of temperature on survival and water relations of *Paederus fuscipes* (Coleoptera: Staphylinidae). J. Med. Entomol. 50:1003–1013. doi:10.1603/ME13058

Bong, L. J., K. B. Neoh, C. Y. Lee, and Z. Jaal. 2014. Effect of diet quality on survival and reproduction of adult *Paederus fuscipes* (Coleoptera: Staphylinidae). J. Med. Entomol. 51:752–759. doi:10.1603/ME13145

Bong, L. J., K. B. Neoh, Z. Jaal, and C. Y. Lee. 2015. *Paederus* outbreaks in human settings: A review of current knowledge. J. Med. Entomol. 52:517–526. doi:10.1093/jme/tjv041

Borroni, G., V. Brazzelli, R. Rosso, and M. Pavan. 1991. *Paederus fuscipes* dermatitis: A histopathological study. Amer. J. Dermatopathol. 13:467–474. doi:10.1097/00000372-199110000-00007

Campbell, A., B. D. Frazer, N. Gilbert, A. P. Gutierrez, and M. Mackauer. 1974. Temperature requirements of some aphids and their parasites. J. Appl. Ecol. 11:431–438. doi:10.2307/2402197

Chatzimanolis, S., J. S. Ashe, and R. S. Hanley. 2004. Diurnal/nocturnal activity of rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae) on Barro Colorado Island, Panama assayed by flight intercept trap. Coleopts. Bull. 58:569–577. doi:10.1649/689.1

Cheng, C. H. 1976. Assessment of rice losses caused by the brown planthopper and the rice green leafhopper. Plant Prot. Bull. 18:147–160. (in Chinese with English abstract)

Cheng, C. H. 1990. Studies on population dynamics and forecasting of population abundance of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* in Chia-nan area. Chinese J. Entomol. 10:1–25. (in Chinese with English abstract)

Cheng, C. H. 1998. Impact of global climate change on crop insect pests in relation to pest control strategies in Taiwan. p.73–85. *in*: Effects of Climate Change on Crop Production (Lin, C. Y. and C. M. Yang, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 71. Taichung, Taiwan. 212 pp. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., L. Y. Chou, and S. C. Chiu. 1984. Biology and natural enemies of *Hedylepta indicata* in Taiwan. J. Agric. Res. China 33:181–189. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.198406.0010

Chu, Y. I. and Y. Hirashima. 1981. Survey of Taiwanese literature on the natural enemies of rice leafhoppers and planthoppers. Esakia 16:33–37.

Dale, D. 1994. Insect pest of rice plant- Their biology and ecology. p.363–485. *in*: Biology and Management of Rice Insects. (Heinrichs, E. A., ed.) Wiley Eastern. New Delhi, India. 794 pp.

de Kraker, J., A. van Huis, J. C. van Lenteren, K. L. Heong, and R. Rabbinge. 2000. Identity and relative importance of egg predators of rice leaffolders (Lepidoptera: Pyralidae). Biol Control 19:215–222. doi:10.1006/bcon.2000.0871

Devi, P. K., D. N. Yadav, and A. Jha. 2003. Biology of *Paederus fuscipes* Curtis (Coleoptera: Staphylinidae). Pest Manag. Econ. Zool. 10:137–143.

Eliopoulos, P. A., D. C. Kontodimas, and G. J. Stathas. 2010. Temperature-dependent development of *Chilocorus bipustulatus* (Coleoptera: Coccinellidae). Environ. Entomol. 39:1352–1358. doi:10.1603/EN09364

Fonseca, A. R., C. F. Carvalho, I. Cruz, B. Souza, and C. C. Ecole. 2015. Development and predatory capacity of Chrysoperla externa (Neuroptera: Chrysopidae) larvae at different temperatures. Rev. Colomb. Entomol. 41:5–11.

Frank, J. H. and K. Kanamitsu. 1987. *Paederus*, sensu lato (Coleoptera: Staphylinidae): Natural history and medical importance. J. Med. Entomol. 24:155–191. doi:10.1093/jmedent/24.2.155

Gadgil, M. and W. H. Bossert. 1970. Life historical consequences of natural selection. Amer. Nat. 104:1–24.

Helgadóttir, F., S. Toft, and L. Sigsgaard. 2017. Negative effects of low developmental temperatures on aphid predation by Orius majusculus (Heteroptera: Anthocoridae). Biol. Control 114:59–64. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.08.002

Hou, Y. M. and Z. Q. Weng. 2010. Temperature-dependent development and life table parameters of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ. Entomol. 39:1676–1684. doi:10.1603/EN10015

Huang, C. Z., Y. Q. Liu, J. Yang, J. Tian, L. Y. Yang, J. Zhang, Y. Q. Li, J. W. Li, C. S. Wang, Y. T. Tu, and J. Tao. 2009. An outbreak of 268 cases of *Paederus* dermatitis in a toy-building factory in central China. Intl. J. Dermatol. 48:128–131. doi:10.1111/j.1365-4632.2009.03876.x

Huang, S. H., C. H. Cheng, and W. J. Wu. 2010. Possible impacts of climate change on rice insect pests and management tactics in Taiwan. Crop Environ. Bioinform. 7:269–279 (in Chinese with Enlish abstract). doi:10.30061/CEB.201012.0006

Joern, A. and S. T. Behmer. 1997. Importance of dietary nitrogen and carbohydrates to survival, growth, and reproduction in adults of the grasshopper *Ageneotettix deorum* (Orthoptera: Acrididae). Oecologia 112:201–208. doi:10.1007/s004420050301

Logan, P. A., R. A. Casagrande, H. H. Faubert, and F. A. Drummond. 1985. Temperature-dependent development and feeding of immature Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ. Entomol. 14:275–283.

doi:10.1093/ee/14.3.275

Lysyk, T. J. 1998. Relationships between temperature and life history parameters of *Trichomalopsis sarcophagae* (Hymenoptera: Pteromalidae). Environ. Entomol. 27:488–498. doi:10.1093/ee/27.2.488

Manley, G. V. 1977. *Paederus fuscipes* (Col.: Staphylinidae): A predator of rice fields in West Malaysia. Entomophaga 22:47–59. doi:10.1007/BF02372990

Ooi, P. A. C. and B. M. Shepard. 1994. Predators and parasitoids of rice insect pests. p.585–612. *in*: Biology and Management of Rice Insects. (Heinrichs, E. A., ed.) Wiley Eastern. New Delhi, India. 774 pp.

Padmavathi, C. H., G. Katti, A. P. Padmakumari, and I. C. Pasalu. 2008. Prevalence, prey preference and predatory potential of *Paederus fuscipes* Curtis and *Ophionea* sp. in rice. J. Biol. Control 22:191–193. doi:10.18311/jbc/2008/3820

Pakyari, H. and A. Enkegaard. 2012. Effect of different temperatures on consumption of two spotted mite, *Tetranychus urticae*, eggs by the predatory thrips, *Scolothrips longicornis*. J. Insect Sci. 12:1–10. doi:10.1673/031.012.9801

Polak, M. and W. T. Starmer. 1998. Parasite-induced risk of mortality elevates reproductive effort in male *Drosophila*. Proc. Biol. Sci. 265:2197–2201. doi:10.1098/rspb.1998.0559

Powell, J. A. and J. A. Logan. 2005. Insect seasonality: Circle map analysis of temperature-driven life cycles. Theor. Popul. Biol. 67:161–179. doi:10.1016/j.tpb.2004.10.001

Régnière, J., J. Powell, B. Bentz, and V. Nealis. 2012. Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling. J. Insect Physiol. 58:634–647.

Schmidt, P. S., L. Matzkin, M. Ippolito, and W. F. Eanes. 2005. Geographic variation in diapause incidence, life history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. Evolution 59:1721–1732. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb01821.x

Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1995. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research. 3rd ed. W. H. Freeman and Company. New York, NY. 887 pp.

Tawfik, M. F. S. and N. A. Abouzeid. 1977. Biology of the rove-beetle *Paederus alfierii* (Coleoptera: Staphylinidae). Pedobiologia 17:51–59.

Thorbek, P. and T. Bilde. 2004. Reduced numbers of generalist arthropod predators after crop management. J. Appl. Ecol. 41:526–538. doi:10.1111/j.0021-8901.2004.00913.x

Tsai, T. J. and H. Chi. 2007. Temperature-dependent demography of *Supella longipalpa* (Blattodea: Blattellidae). J. Med. Entomol. 44:772–778. doi:10.1093/jmedent/44.5.772

Wagner, T. L., H. I. Wu, P. J. H. Sharpe, R. M. Schoolfield, and R. N. Coulson. 1984. Modeling insect development rates: A literature review and application of a biophysical model. Ann. Entomol. Soc. Amer. 77:208–225. doi:10.1093/aesa/77.2.208

Wang, Y. C., P. C. Fan, and J. C. Liu. 1969. Seasonal bullous dermatitis caused by rove beetle (*Paederus fuscipes* Curtis, 1826) in Taiwan. Chinese J. Microbiol. 2:131–138.

Wermelinger, B. and M. Seifert. 1999. Temperature-dependent reproduction of the spruce bark beetle *Ips typographus*, and analysis of the potential population growth. Ecol. Entomol. 24:103–110. doi:10.1046/j.1365-2311.1999.00175.x

Effects of Temperature on Development and Reproduction of the Rove Beetle, *Paederus fuscipes* Curtis, Feeding on *Nilaparvata lugens* (Stål)

Shou-Horng Huang[1], Ching-Huan Cheng[2], and Po-Hung Chen[3,*]

Abstract

Huang, S. H., C. H. Cheng, and P. H. Chen. 2020. Effects of temperature on development and reproduction of the rove beetle, *Paederus fuscipes* Curtis, feeding on *Nilaparvata lugens* (Stål). J. Taiwan Agric. Res. 69(3):218–226.

The rove beetle, *Paederus fuscipes* Curtis, can predate many species of insects, and is an important natural enemy against insect pests in paddy field. This study was conducted to evaluate the life history parameters of the rove beetle by incubating at 15, 20, 25 and 30℃ . The results showed that the shortest developmental periods of egg, larval and pupal stages at 30℃ were 3.6, 11.6 and 3.0 d, respectively, whereas the threshold temperatures of development were 8.8, 9.4 and 12.3℃. The sums of effective accumulated temperature were 73.4, 232.6 and 53.8 day-degree, respectively. The fecundity was highest (190.8 eggs/female) at 25℃, whereas the average of egg-laid was highest (2.2–2.4 eggs/female) at 25℃ and 30℃. The consumed numbers of brown planthopper nymphs were highest at 25℃ for larvae and adult males. There were 37.6 of 1st instar nymphs and 202.2 of 3rd instar nymphs respectively. However, for the female, the highest consumed numbers were 257.2 and 279.8 of 3rd instar nymphs at 20℃ and 25℃. The highest daily consumed numbers for larvae and adult females were 2.6 and 3.5 at 25℃, respectively. Therefore, our results suggest that the optimal temperature is around 25–30℃ for the development and reproduction of *P. fuscipes* local populations.

Key words: *Paederus fuscipes* Curtis, Temperature, Development, Reproduction.

Received: March 6, 2020; Accepted: May 22, 2020.

[*] Corresponding author, e-mail: chenph@dns.caes.gov.tw

[1] Associate Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Past Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(3):227–240 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202009_69(3).0005

研究報告

甘藍小孢子培養影響因子之優化研究

夏奇鋇[1,*] 陳威臣[2] 曹進義[3] 林子凱[4] 紀銘坤[5]

摘要

夏奇鋇、陳威臣、曹進義、林子凱、紀銘坤。2020。甘藍小孢子培養影響因子之優化研究。台灣農業研究 69(3):227–240。

甘藍是台灣最重要的葉菜類蔬菜，本研究之目的在提高甘藍小孢子培養技術的效率，用以建構甘藍雙單倍體 (doubled-haploid; DH) 生產系統，加速甘藍育種流程。篩選市售甘藍共 14 個栽培種，其中 13 個栽培種之小孢子在培養後具有胚分化反應，以取自 2.50–3.50 mm 大小花蕾具有高於或等於 3.51–4.50 mm 大小花蕾之胚分化率，其中以「金春」和「新威」栽培種的胚分化率最高，分別為 15.89 及 10.17 個胚/皿。比較 NLN [Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter (1981)] 培養液中鹽類濃度及活性炭與瓊脂醣懸浮液組成對於「金春」和「新威」甘藍小孢子胚分化率的影響，兩栽培種皆以 1/2 NLN 較全量 NLN 培養液為佳，但活性炭與瓊脂醣懸浮液處理間則不具顯著差異。比較「金春」和「新威」甘藍小孢子在含有 13% 蔗糖或麥芽糖之培養液中培養，或先以含有 16% 蔗糖之培養液培養 2 d 後，再將蔗糖濃度降至 10% 繼續培養，共 3 種處理，結果顯示兩栽培種皆以含 13% 蔗糖處理可獲得最高之胚分化率。比較 32℃及 35℃高溫處理 1 d 後，再分別於 22℃或 25℃中靜置培養對「新威」小孢子胚分化的影響，結果顯示僅第一階段高溫處理的影響效果顯著，其中以 32℃處理 1 d 再續以 25℃培養可獲得之胚數最高，為每皿 14.00 個胚。在胚發芽率方面，「新威」甘藍的子葉期胚經 4℃脫水 1 wk 後，接種於含有 16 g L^{-1} 洋菜的培養基中，發芽率可達 91.81%；但「金春」使用相同處理之發芽率僅 27.77%。將 4℃脫水 1 wk 後之「金春」小孢子胚接種於含有不同濃度洋菜的培養基中於室溫培養，結果顯示 10–16 g L^{-1} 洋菜未能提高「金春」之發芽率；但若將小孢子胚先接種於 16 g L^{-1} 洋菜培養基，同時置於 4℃培養 1 wk，之後移至室溫繼續培養，可將「金春」之發芽率提高至 94.00%。以流式細胞儀分析「金春」和「新威」甘藍的 DH 植株比例，分別為 53.4% 和 12.5%，顯示不同栽培種小孢子胚染色體之自然倍加比率差異大。

關鍵詞：甘藍、小孢子胚分化、雙單倍體。

前言

甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) 原生於地中海沿岸，由不結球野生甘藍演化而來。根據農糧署統計資料，2018 年甘藍的種植面積為 8,339 ha，僅次於竹筍，總產值達 56.24 億元，為全台蔬菜產品之冠 (Council of Agriculture 2019)。台灣目前栽培最多的甘藍品種為 1954 年自日本引進的「初秋」，至今已超過 60 餘年。「初秋」口感佳但不耐高溫，且易感染黑腐病和軟腐病，然多年來市場上並未出現足以取代「初秋」角色之新品種，部分原因在於台灣的甘藍育種存有許多客觀障礙，如夏季炎熱但冬季平地低溫不足，植株不易自然開花，必須以適度成熟的植株經 2 個月春化處理後才能抽苔開花。此外，甘藍為異交作物，具有自交

投稿日期：2020 年 2 月 14 日；接受日期：2020 年 6 月 30 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
4 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。
5 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

不親和性，為了生產一代雜交種 (F_1) 所需之自交系，必須透過人工蕾期授粉克服自交障礙，在經過 6–8 代自交培育後才能作為試交評估之用。因此，如何縮短育種所需時間並提高選種效率及降低育種成本，乃是甘藍育種亟需改進的方向。

同質雙單倍體 (doubled-haploid; DH) 係指單倍體細胞在自然狀態或經由人工處理後，染色體倍加，形成具有同質基因型的植株。DH 植株因其等位基因具有同質性，是遺傳上 100% 的純系，因此可取代自交系作為 F_1 生產所需之親本，縮短 F_1 育成所需之時間，並提高田間選拔的效率 (Forster & Thomas 2005)。獲得 DH 植株的方法依作物別而有差異 (Germanà 2011)，十字花科蕓薹屬 (*Brassica*) 作物利用培養未成熟花粉 (小孢子) 生產 DH 植株之技術已臻成熟，值得我們善加利用以改進甘藍育種效率 (Babbar *et al*. 2004; Ferrie & Caswell 2011)。

甘藍是台灣目前最重要的葉用蔬菜，但其育種困難度遠高於其他甘藍類 (*B. oleracea*) 蔬菜。本研究擬將過去在青花菜與花椰菜所建立的小孢子培養技術 (Hsia *et al*. 2017a, 2017b)，應用於甘藍之小孢子培養，並對影響甘藍小孢子培養效率的各種關鍵因子加以測試，藉以提高甘藍 DH 的育成效率，縮短甘藍自交系育成所需的時間，加快甘藍新品種的育成速度。

材料與方法

供試材料與栽培管理

供試甘藍栽培種分別為購自瀧井種苗 (Takii Seed Co., Ltd., Taichung City, Taiwan) 的「初秋」(‘K-Y Cross’)、農友種苗公司 (Known-you Seed Co., Ltd., Kaohsiung City, Taiwan) 的「綠秋」(‘Green Autumn’) 與「高峰」(‘Tops’)，豐田種子行 (Po Yu Trading Co., Ltd., Kaohsiung City, Taiwan) 的「大華」 (‘Da Hua’)、「大吉」(‘Da Ji’)、「大樂」(‘Da Le’)、「大利」(‘Da Li’)、「新威」(‘Shin Wei’)、「夏天」(‘Summer’)、「大福」 (‘Da Fu’) 與「金春」(‘Jin Chuen’)，稼穡種子公司 (Suntech Seed Co., Ltd., Tainan City, Taiwan) 的「夏安」 (‘Tropical Angel’)，欣樺種苗公司 (Sing-Flow Seed Co., Ltd., Tainan City, Taiwan) 的「台中 1 號」(‘Taichung 1’) 以及宇辰農業生物科技公司 (Your Chain Seed Co., Ltd., Tainan City, Taiwan) 的「台中 2 號」(‘Taichung 2’) ，共 14 個栽培種。將甘藍種子播於 104 孔穴盤中，於日/夜溫 26℃/20℃、自然光照之精密溫室內栽培 4 wk 後，將小苗移植至 18 cm 硬盆。於相同環境中繼續栽培 8 wk 後，將盆栽移入 6℃春化處理生長箱中栽培 60 d。再將植株移入日/夜溫 25℃/20℃、光照 12 h 生長箱中繼續栽培至開花，並於花蕾生長至適當大小時剪取使用。甘藍於 18 cm 硬盆生長期間，每週施用一次 1 g L^{-1} 花寶 2 號 (N : P_2O_5 : K_2O = 20 : 20 : 20) 肥料，春化處理後改施濃度相同的花寶 3 號 1 g L^{-1} (N : P_2O_5 : K_2O = 10 : 30 : 20) 肥料。

小孢子培養

小孢子分離之流程修改自 Custers (2003)，實際操作流程同 Hsia *et al*. (2017b) 方法。將小孢子懸浮液濃度調整至每毫升含 4 × 10^4 個小孢子，以 55 mm × 15 mm 培養皿每皿分裝 5 mL，並以石蠟膜加封。置於 32℃培養箱中，以黑暗培養 24 h，再移至 25℃於黑暗中靜置培養 2 wk 後，將培養皿移至水平迴轉式震盪器，以 60 rpm 震盪培養，每日照光 14 h，光照強度為 30.3 μmol m^{-2} s^{-1}。小孢子分化生長至子葉期後，將小胚取出，調查每皿產生之胚數。

NLN 鹽類濃度與活性炭懸浮液組成對小孢子胚分化之影響

配製活性炭 (activated charcoal, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 與低熔點瓊脂醣 (low gelling agarose, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 不同比例混合之懸浮液，分別為 A (2% 活性炭，1% 瓊脂醣)、B (2% 活性炭，2% 瓊脂醣) 及 C (1% 活性炭，2% 瓊脂醣)。配製含全量及半量 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) 鹽類濃度之培養液 (Lichter 1981)，並添加 13% 蔗糖 (代號分別為 NLN 與 1/2 NLN)。取甘藍「新威」與「金春」

2.50–3.50 mm 大小之花蕾，將分離後之小孢子分別以 NLN 或 1/2 NLN 培養液調製如上述之懸浮液，每皿 5 mL 懸浮液加入 0.1 mL 活性炭與瓊脂醣之混合液，小孢子培養方法及產胚調查同前所述。

不同醣類及其濃度對甘藍小孢子胚分化的影響

小孢子分別取自「新威」2.50–3.50 mm 花蕾及「金春」3.51–4.50 mm 花蕾，分別培養於添加 13% 蔗糖或 13% 麥芽糖的 1/2 NLN 培養液中，或先於含有 16% 蔗糖的 1/2 NLN 培養液中培養 2 d 後，進行離心。將原培養液更換為含 10% 蔗糖之 1/2 NLN 培養液後繼續培養，共 3 種處理。小孢子培養方法及產胚調查同前所述。

二階段溫度處理對胚分化的影響

取自「新威」之 2.50–4.50 mm 花蕾依上述方法調製小孢子懸浮液，並分裝於培養皿，將培養皿分別置入 32℃和 35℃培養箱中，於黑暗下培養 1 d。將不同溫度處理之培養皿取出後，各自分成2組，分別置於22℃和25℃培養箱中，於黑暗下繼續培養 2 wk。之後小孢子培養方法及產胚調查同前所述。

洋菜濃度對小孢子胚發芽的影響

於含有 20 g L^{-1} 蔗糖之 B5 鹽類基本培養基中 (Gamborg *et al*. 1968)，分別添加 10、12、14 和 16 g L^{-1} 洋菜 (Bacto agar, BD, Baltimore, MD, USA) 配製發芽培養基。將胚軸長約 1–2 mm 之子葉期胚從培養液中取出，放入鋪有乾燥濾紙之 55 mm × 15 mm 培養皿中，於 4℃黑暗下進行 1 wk 脫水處理。將脫水胚取出後，接種於上述含有不同濃度洋菜的 B5 鹽類培養基 (Gamborg *et al*. 1968)，培養 4 wk 後記錄小孢子胚的發芽率。

發芽前處理對子葉期胚發芽之影響

將胚軸長約 1–2 mm 之子葉期胚自培養液中取出，分別進行 3 種前處理：(1) 將胚直接接種於發芽培養基中，置於 25℃下培養作為對照組；(2) 將胚先放入鋪有乾燥濾紙之 55 mm × 15 mm 培養皿，置於 4℃黑暗環境下進行 1 wk 脫水處理後，再接種於發芽培養基，在 25℃下培養；(3) 將胚直接接種於發芽培養基中，於 4℃黑暗環境下培養 1 wk 後，再移至 25℃下繼續培養。發芽培養基為 B5 鹽類培養基添加 20 g L^{-1} 蔗糖與 16 g L^{-1} 洋菜。胚發芽率皆於 25℃培養 4 wk 後調查，並同時切取芽體繼代至含有 MS 鹽類 (Murashige & Skoog 1962) 之固體培養基中進行發根培養。

染色體倍體性檢測

切取瓶內或出瓶植株之完全展開葉約 1 cm^2 大小，加入 CyStain UV Precise P Kit (Partec, Görlitz, Germany) 0.2 mL 萃取緩衝液，以刀片將葉片組織細切後，再添加 0.8 mL 染色液。以 30 μm 過濾網過濾，濾液靜置 3 min 後，以流式細胞儀 (ploidy analyzer, Partec, Görlitz, Germany) 檢測染色體之倍體數。每一葉片取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞核數為 5,000 個。染色體倍數判別係與孢子供體植株之葉片作為 2 倍體比較。

統計分析方法

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 套裝統計分析軟體進行 analysis of variance (ANOVA) 變方分析。若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則利用 least significant difference (LSD) test 比較各處理平均值間之差異。

結果

不同栽培種及其花蕾大小對小孢子胚分化之影響

比較取自 14 個甘藍栽培種之 2 種不同大小花蕾中所含的小孢子量及其胚分化率 (胚數/皿)，結果如表 1 所示。其中，栽培種、花蕾大小及兩因子交感作用對於胚分化率的影響，皆達極顯著標準 ($P < 0.01$)。14 個甘藍栽培種不論是取自 2.50–3.50 mm 或是 3.51–4.50 mm 花蕾，每蕾平均小孢子數最少者為「大樂」之

表 1. 不同甘藍栽培種及其花蕾大小對誘導小孢子胚形成之影響。

Table 1. Effect of cabbage cultivar and its bud size on induction of microspore embryogenesis[z].

Cultivar (栽培種名)	Bud size (mm)	Microspores/bud	Embryos/petri dish
‘Jin Chuen’ (「金春」)	2.50–3.50	1.06×10^5	15.89 ± 7.67 a[y]
	3.51–4.50	1.46×10^5	10.90 ± 4.31 a
‘Shin Wei’ (「新威」)	2.50–3.50	1.33×10^5	10.17 ± 3.43 a
	3.51–4.50	1.38×10^5	2.83 ± 3.06 b
‘Summer’ (「夏天」)	2.50–3.50	0.92×10^5	5.30 ± 3.20 a
	3.51–4.50	0.63×10^5	0.33 ± 0.52 b
‘Da Fu’ (「大福」)	2.50–3.50	0.63×10^5	4.83 ± 1.60 a
	3.51–4.50	0.33×10^5	0.86 ± 0.90 b
‘Tropical Angel’ (「夏安」)	2.50–3.50	1.13×10^5	1.11 ± 0.81 a
	3.51–4.50	1.07×10^5	1.18 ± 0.81 a
‘K-Y Cross’ (「初秋」)	2.50–3.50	1.34×10^5	1.00 ± 1.12 a
	3.51–4.50	1.64×10^5	0.00 ± 0.00 b
‘Da Hua’ (「大華」)	2.50–3.50	0.98×10^5	0.19 ± 0.40 b
	3.51–4.50	1.15×10^5	1.00 ± 0.73 a
‘Tops’ (「高峰」)	2.50–3.50	1.19×10^5	0.70 ± 0.56 a
	3.51–4.50	1.29×10^5	0.13 ± 0.34 b
‘Da Le’ (「大樂」)	2.50–3.50	0.27×10^5	0.00 ± 0.00 a
	3.51–4.50	1.37×10^5	0.63 ± 0.96 a
‘Da Li’ (「大利」)	2.50–3.50	0.61×10^5	0.31 ± 0.60 a
	3.51–4.50	0.64×10^5	0.53 ± 0.52 a
‘Taichung 2’ (「台中 2 號」)	2.50–3.50	0.64×10^5	0.00 ± 0.00 a
	3.51–4.50	0.81×10^5	0.50 ± 0.86 a
‘Taichung 1’ (「台中 1 號」)	2.50–3.50	0.84×10^5	0.05 ± 0.22 a
	3.51–4.50	0.96×10^5	0.35 ± 1.46 a
‘Da Ji’ (「大吉」)	2.50–3.50	0.97×10^5	0.00 ± 0.00 a
	3.51–4.50	1.04×10^5	0.25 ± 0.46 a
‘Green Autumn’ (「綠秋」)	2.50–3.50	0.76×10^5	0.00 ± 0.00 a
	3.51–4.50	0.92×10^5	0.00 ± 0.00 a
Cultivar			**
Bud size			**
Cultivar × bud size			**

[z] Microspores were cultured in the 1/2 NLN-13 medium with 4×10^4 microspores per mL.
[y] Means with different letters in the same cultivar are significantly different (*P* < 0.05) by least significant difference (LSD) test.
** Significant at 0.01 level.

0.27×10^5 個小孢子/蕾；最多者為「初秋」之 1.64×10^5 個小孢子/蕾。每蕾平均小孢子數最高與最低之栽培種相差達 6.1 倍，圖 1 為「初秋」小孢子培養至獲得 DH 馴化苗之情形。以顯微鏡觀察 14 個甘藍栽培種的花粉，顯示各栽培種的花粉發育正常並無敗育現象 (資料未顯示)。比較取自不同大小花蕾內小孢子數之多寡，各栽培種中大多以 3.51–4.50 mm 花蕾具有較高之平均小孢子數，只有「夏天」、「大福」、「夏安」3 個栽培種以取自 2.50–3.50 mm

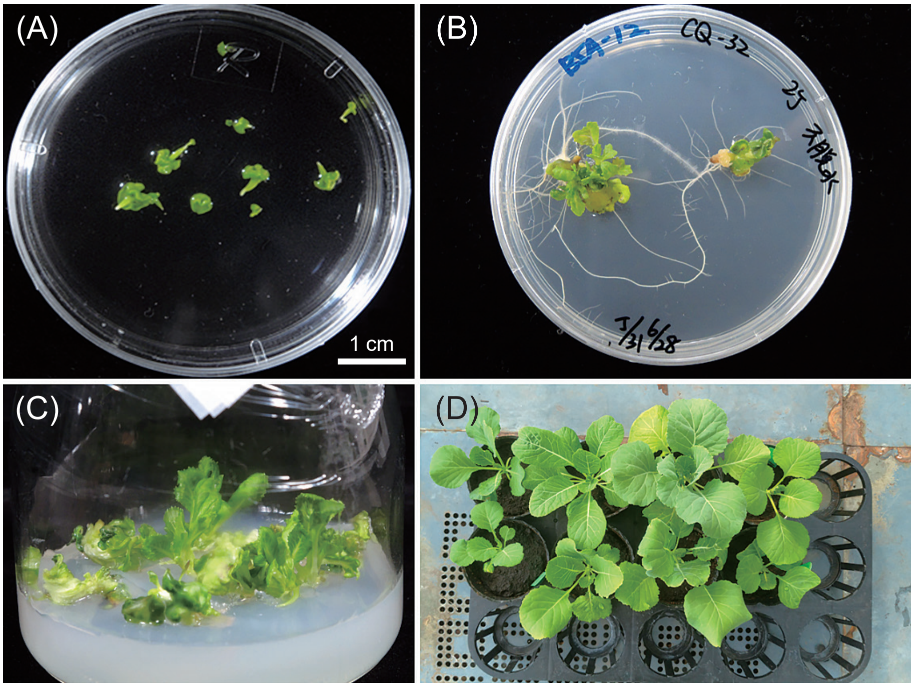

圖 1. 甘藍「初秋」小孢子培養獲得雙單倍體 (A) 子葉期胚；(B) 子葉期胚發芽；(C) 芽體生長；及 (D) 出瓶馴化後之雙單體小苗。

Fig. 1. Microspore culture of cabbage 'K-Y Cross' (A) cotyledonary embryos; (B) germination of embryos; (C) growth of shoots; and (D) acclimated DH plantlets.

花蕾具有較高之平均小孢子數/蕾。比較各栽培種取自不同大小花蕾的胚分化率，結果顯示在 14 個栽培種中有 13 個以取自 2.50–3.50 mm 花蕾其胚分化率優於或等於 3.51–4.50 mm 花蕾，其中僅 1 個栽培種「大華」顯示取自 3.51–4.50 mm 花蕾者有較高的胚分化率。上述 14 個栽培種中，以「金春」和「新威」的小孢子胚分化率最高，取自 2.50–3.50 mm 花蕾每皿分化之胚數在 10.17–15.89 之間，因此後續各項影響因子的優化試驗皆以這兩個栽培種進行。

NLN 鹽類濃度與活性炭懸浮液組成對小孢子胚分化之影響

十字花科作物小孢子培養最常使用之培養基為 NLN 鹽類配方 (Nitsch & Nitsch 1967)。本研究比較 1/2 或全量 NLN 培養液中分別加入活性炭與瓊酯醣以不同比例混合之懸浮液。表 2 顯示參試之 2 因子中，以 NLN 鹽類濃度對「金春」和「新威」的小孢子胚分化率具有極顯著之影響 ($P < 0.01$)，但不同比例混合之活性炭與瓊酯醣懸浮液及其與前者間的交感則無顯著影響。NLN 鹽類濃度在兩栽培種中皆以 1/2 較全量為佳，「金春」和「新威」在 1/2 NLN 培養液中的胚分化率，分別為 10.50–13.20 胚/皿和 6.67–10.60 胚/皿，顯著高於在全量 NLN 培養液中的 0.00–1.67 胚/皿和 4.29–7.00 胚 / 皿。

不同醣類及其濃度對甘藍小孢子胚分化的影響

以取自「金春」和「新威」甘藍不同大小花蕾所分離出的小孢子，分別置於含有 13% 蔗糖或 13% 麥芽糖的 1/2 NLN 培養液中培養，以及先以 16% 蔗糖培養 2 d 再以 10% 蔗糖繼續培養。此 3 種處理對不同大小花蕾之小孢子胚分化的影響結果顯示，花蕾大小及不同醣類及其濃度處理對兩栽培種皆有顯著影響，但

表 2. 培養液 NLN 鹽類濃度與活性碳懸浮液組成對 2 種甘藍栽培種小孢子胚形成之影響。

Table 2. Effect of salt strength of NLN medium and charcoal-agarose suspension on microspore embryogenesis of two cabbage cultivars[z].

Salt strength of medium	Charcoal suspension[y]	Embryos/petri dish	
		'Jin Chuen' (「金春」)	'Shin Wei' (「新威」)
1/2 NLN	A	10.50 ± 5.07 a[x]	10.17 ± 3.43 a
	B	12.80 ± 3.77 a	10.60 ± 3.21 a
	C	13.20 ± 2.77 a	6.67 ± 1.03 ab
NLN	A	1.67 ± 1.75 b	7.00 ± 4.18 ab
	B	0.83 ± 0.75 b	4.29 ± 3.55 b
	C	0.00 ± 0.00 b	5.40 ± 2.97 b
Medium		**	**
Charcoal		NS	NS
Medium × charcoal		NS	NS

[z] NLN: Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter (1981). Microspores were inoculated with 4×10^4 microspores per mL.
[y] A: 2% charcoal + 1% agarose; B: 2% charcoal + 2% agarose; and C: 1% charcoal + 2% agarose.
[x] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.
** Significant at 0.01 level; NS: non significant.

兩因子間的交感效應僅「新威」達到顯著水準(表 3)。兩栽培種皆以取自 2.50–3.50 mm 花蕾較 3.51–4.50 mm 花蕾具有較高之胚分化率。醣類處理中，兩栽培種皆以 13% 蔗糖表現最佳，13% 麥芽糖以及蔗糖 2 階段處理其次，但後 2 處理間的差異不顯著。6 個處理中以取自 2.50–3.50 mm 花蕾之小孢子培養於含有 13% 蔗糖之 1/2 NLN 培養液具有最高的胚分化率，「金春」和「新威」平均每皿分別產生 15.89 個和 17.50 個胚。

二階段溫度處理對「新威」甘藍胚分化的影響

取「新威」小孢子於 32℃或 35℃高溫培養 1 d 後，將相同溫度處理之樣品分成 2 組，分別置於 22℃和 25℃進行 2 wk 培養，結果如表 4

表 3. 醣類及其濃度與花蕾大小對 2 種甘藍栽培種小孢子胚形成之影響。

Table 3. Effect of carbohydrate type and its concentration on microspore embryogenesis of two cabbage cultivars in two bud sizes[z].

Bud size (mm)	Carbohydrate treatment	Embryos/petri dish	
		'Jin Chuen' (「金春」)	'Shin Wei' (「新威」)
2.50–3.50	13% sucrose	15.89 ± 7.67 a[y]	17.50 ± 3.78 a
	13% maltose	0.75 ± 0.89 c	0.50 ± 0.55 bc
	16% sucrose 2 d + 10% sucrose	0.13 ± 0.35 c	0.00 ± 0.00 c
3.51–4.50	13% sucrose	10.90 ± 4.31 b	4.00 ± 4.24 b
	13% maltose	0.00 ± 0.00 c	1.33 ± 1.53 bc
	16% sucrose 2 d + 10% sucrose	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c
Bud size		*	**
Carbohydrate		**	**
Bud size × carbohydrate		NS	**

[z] Microspore culture medium was 1/2 NLN with 4×10^4 microspores per mL.
[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.
* Significant at 0.05 level; ** significant at 0.01 level; NS: non significant.

表 4. 二階段溫度組合處理對「新威」甘藍小孢子培養胚分化之影響。

Table 4. Effect of two stage temperature treatments on microspore embryogenesis of 'Shin Wei' cabbage^z.

Temperature (℃)^y		
1st stage	2nd stage	Embryos/petri dish
32	22	8.75 ± 1.71 b^x
	25	14.00 ± 5.48 a
35	22	1.33 ± 0.58 c
	25	2.00 ± 1.41 c
1st stage		**
2nd stage		NS
1st × 2nd stage		NS

^{z} Microspores were cultured in the 1/2 NLN medium with 4 × 10^4 microspores per mL.
^{y} Microspores were cultures at 1st temperature for 1 d in the dark followed by at 2nd temperature for 2 wk.
^{x} Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.
**Significant at 0.01 level; NS: non significant.

所示。第一階段之高溫處理對小孢子的胚分化有極顯著的影響，第二階段培養溫度及其與第一階段高溫處理的交感效應影響皆不顯著。比較高溫處理間，以32℃較35℃有較高的胚分化率，4 個處理中則以 32℃培養 1 d 後接續以25℃培養 2 wk 可獲得 14.00 胚/皿為最高。

洋菜濃度對小孢子胚發芽的影響

將「新威」和「金春」長至子葉期的胚取出，移至鋪有濾紙的培養皿中，於 4℃脫水 1 wk，再接種至發芽培養基中進行發芽，結果如表 5 所示。「新威」胚發芽率可達 91.81%，但「金春」發芽率僅 27.77%，在相同條件下 2 品種的胚發芽率差異明顯。

為提高「金春」的發芽率，將 4℃脫水處理後的子葉期胚接種於添加 10、12、14 和 16 g L^{-1} 濃度洋菜之培養基中培養，結果如表 6 所示。發芽培養基之洋菜濃度對「金春」子葉期胚的

表 5. 兩個甘藍栽培種之小孢子子葉期胚在 B5A-16 培養基中發芽之情形。

Table 5. Germination of microspore-derived cotyledonary embryos of two cabbage cultivars on the B5A-16 medium^z.

Cultivar	Tested embryo	Germinated embryo	Germination rate (%)
'Jin Chuen' (「金春」)	99	26	27.77 ± 22.23
'Shin Wei' (「新威」)	252	231	91.81 ± 9.42

^{z} Cotyledonary embryos were put into a petri dish with filter paper at 4℃ for 1 wk dehydration before subculturing into the germination medium B5A-16. B5A-16 medium contained 20 g L^{-1} sucrose and 16 g L^{-1} Bacto agar in the B5 salt medium.

表 6. 發芽培養基中之洋菜濃度對甘藍「金春」子葉期胚發芽之影響。

Table 6. Effect of agar concentration in the medium on cotyledonary embryo germination of 'Jin Chuen' cabbage^z.

Agar (g L^{-1})	Tested embryo	Survival rate (%)	Germination rate (%)
10	40	52.50 ± 9.57 a^y	17.50 ± 12.58 a^y
12	40	27.50 ± 12.58 ab	20.00 ± 8.16 a
14	37	41.08 ± 41.46 ab	17.50 ± 23.63 a
16	30	10.00 ± 17.32 b	3.33 ± 5.77 a

^{z} Cotyledonary embryos were put into a petri dish with filter paper at 4℃ for 1 wk dehydration before subculturing into the germination medium.
^{y} Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

發芽率並無顯著影響，於 10–14 g L^{-1} 洋菜濃度，發芽率介於 17.50–20.00% 之間，洋菜濃度提高至 16 g L^{-1} 時，發芽率降至 3.33%，但 4 種濃度間的差異並不顯著。相反的，不同濃度洋菜對子葉期胚的成活率則具有顯著影響，以 10 g L^{-1} 最佳，成活率可達 52.50%。洋菜濃度提高到 16 g L^{-1} 時，成活率明顯降低至 10.00%，且高濃度洋菜 (14–16 g L^{-1}) 處理之機差較高。

發芽前處理對子葉期胚發芽之影響

將「金春」子葉期胚自培養液中取出，進行 3 種前處理，一為直接將子葉期胚接種於發芽培養基置於 25℃中持續培養之對照組；二為直接接種胚於發芽培養基，但先於 4℃培養 1 wk；三為先將子葉期胚置於鋪有濾紙之培養皿中，於 4℃中脫水 1 wk。第一及第二處理在 4℃培養 1 wk 後，皆同樣移至 25℃下繼續培養，結果顯示如表 7。3 種處理中，以子葉期胚接種於發芽培養基並於 4℃培養 1 wk 後再移至 25℃培養的發芽率最高，達 94.00%。直接培養於 25℃及於 4℃濾紙脫水 1 wk 後再將發芽培養基移至 25℃中培養的發芽率，分別為 35.56% 與 16.67%，後 2 處理間差異不顯著，但與前一處理間有顯著差異。

以流式細胞儀檢測「金春」與「新威」出瓶苗株的染色體倍體數，「金春」甘藍共檢測 34 株，DH 植株占所有出瓶苗株達 53.4% (表 8)。「新威」甘藍檢測 120 株出瓶苗，DH 植株僅占 12.5%，高達 75.8% 為單倍體。

討論

蕓薹屬蔬菜的單倍體植株最早是從大油菜 (*Brassica napus*) 和小油菜 (*Brassica campestris*) 的花藥培養中所獲得 (Keller *et al*. 1975; Thomas & Wenzel 1975)。自 Lichter (1982) 以大油菜發展出游離小孢子培養技術後，不僅效率較花藥培養提高，且再生植株來自於體細胞的疑慮得以降低，小孢子培養技術從此被廣泛應用於十字花科作物 DH 的生產 (Pratap *et al*. 2009)。十字花科甘藍類 (*Brassica oleracea* L.) 包括有甘藍、花椰菜和青花菜等重要的蔬菜，其小孢子培養方法大都沿用油菜所建立之方法，並加以修正改進 (Custers 2003)；但甘藍類蔬菜利用小孢子生產 DH 植株的效率，一般而言不如油菜，所遭遇的障礙主要可歸納為：小孢子胚分化率低、小孢子胚的發芽率低以及 DH 植株比例偏低等三項。其中，影響甘藍類蔬菜小孢子胚分化率的因子可細分為：

表 7.　不同發芽前處理對「金春」甘藍子葉期胚發芽之影響。

Table 7.　Effect of various pre-treatments on cotyledonary embryo germination of ‘Jin Chuen’ cabbage[z].

Pre-treatment	Tested embryos	Germination rate (%)
25℃	26	35.56 ± 33.55 b[y]
4℃ filter paper dry for 1 wk	30	16.67 ± 20.82 b
4℃ for 1 wk	42	94.00 ± 5.48 a

[z] Cotyledonary embryos were subcultured on the germination medium directly and cultured at 25℃; or were put into a petri dish with or without filter paper at 4℃ for 1 wk dehydration before subculturing on the germination medium. Germination medium of B5A-16 contained 20 g L^{-1} sucrose and 16 g L^{-1} Bacto agar in the B5 salt medium.

[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

表 8.　以流式細胞儀檢測「金春」和「新威」甘藍小孢子再生植株的倍體數表現。

Table 8.　Ploidy level of microspore-derived plants of cabbage ‘Jin Chuen’ and ‘Shin Wei’ analyzed by flow cytometry.

Cultivar	No. of analyzed plants	Ploidy level (%) C	2C	4C	Others[z]
‘Jin Chuen’ (「金春」)	34	14.7	53.4	5.9	23.5
‘Shin Wei’ (「新威」)	120	75.8	12.5	2.5	9.2

[z] Others include 3C and chimera plants.

品種基因型、開花溫度、小孢子的發育階段及小孢子培養條件等 (Ahmadi *et al*. 2012)。Pratap *et al*. (2009) 指出植株於有利開花的溫度中栽培，可提高小孢子的胚分化率。由於本研究中所使用的甘藍植株於春化處理後均栽培於生長箱中，在溫度方面受到精準的控制，降低了植株在開花階段受到環境溫度的影響。在基因型影響方面，學者對於青花菜小孢子培養的研究指出，小孢子的胚分化特性可能由少數基因所控制，致使不同物種或不同品種的小孢子胚分化率差異很大 (Da Silva Dias 2001)。改善之道包括消極的篩選品種及積極的將胚分化低反應品種與高反應品種進行雜交改進，但後法所需之時間與人力較多 (Touraev *et al*. 1997; Shariatpanahi *et al*. 2006; García *et al*. 2017)。本研究依據前期於花椰菜與青花菜所建立之小孢子培養技術，將其應用於市售甘藍栽培種之小孢子培養 (Hsia *et al*. 2017a, 2017b)，除對市售甘藍栽培種的小孢子胚誘導反應進行瞭解外，同時也對影響甘藍小孢子培養的各項關鍵因子加以改進。

根據本研究 14 個甘藍栽培種的小孢子培養結果 (表 1)，不同栽培種其每一花蕾中所含的平均小孢子量介於 0.27–1.64 × 10^5 個，同一栽培種中不同大小花蕾所含的小孢子數則差異不大；但不同栽培種每一花蕾中所含的小孢子數則具有明顯差異，推測每一花蕾中所含的小孢子數為各栽培種之特性。過去的研究常以每一花蕾所得之胚數來比較胚分化率，但小孢子培養過程常因消毒不完全或操作不當，導致部分材料污染必須丟棄，因此不易以原始使用之花朵數作為最後比較之基準 (Gu *et al*. 2003)。相反的，因每一培養皿中均使用相同數量之小孢子接種 (4 × 10^4 個/mL × 5 mL)，因此可直接以未受污染的皿數中所獲得之平均胚數 (平均胚數/皿) 來比較，更能具體表達各栽培種以每一個小孢子為單位對胚誘導反應的比例。依據 14 個甘藍栽培種之胚分化率，將其分為三群，胚分化率最高之一群 (> 4.0 胚/皿) 共有 4 栽培種占 28.6%，其中以「金春」與「新威」具有較高之小孢子量 (1.06–1.46 × 10^5 個)，但「夏天」與「大福」之小孢子量 (0.33–0.92 × 10^5 個) 在 14 栽培種中則偏低，顯示每一花蕾中所含之小孢子數與其胚分化率並未具直接關聯性 (表 1)。第二群栽培種其每皿平均胚分化率介於 0.05–4.00 胚/皿之間，共 9 個栽培種占 64.3%。第三群為兩種花蕾大小均無出胚反應的栽培種，僅有「綠秋」1 個栽培種占 7.1%。總體而言，14 個栽培種中有 13 個具有胚分化反應，亦即本研究甘藍栽培種之小孢子中高達 92.9% 具有胚分化的反應，但大多數栽培種的胚分化率偏低，顯示必須對影響甘藍小孢子胚分化的各項關鍵因子加以優化。

選擇適當發育階段的小孢子作為培養材料，是影響胚分化的重要因子之一，過去之研究多數認為，小孢子介於單核晚期到雙核早期之間的發育階段，是最適合培養的時期 (Bhowmik *et al*. 2011)。小孢子發育階段的判別，除了進行細胞染色並以顯微鏡進行觀察外，還可藉助梯度離心法分離小孢子，以及藉由流式細胞儀分析瞭解小孢子發育階段的分布比例等；但在實務操作上，以依據花蕾長度作為判別標準最常被採用 (Takahata *et al*. 1993)。本試驗將甘藍花蕾長度分為 2.50–3.50 mm 和 3.51–4.50 mm 兩種大小進行試驗。結果顯示在 14 個栽培種中，僅有 1 個栽培種「大華」其 3.51–4.50 mm 花蕾較 2.50–3.50 mm 花蕾具有顯著較高的胚分化率，其他 13 個甘藍栽培種則皆以取自 2.50–3.50 mm 花蕾具有較高或相近的胚分化率。推測 2.50–3.50 mm 長度之花蕾內可能含有較高比例適合培養時期之小孢子，因此有利於胚分化的表現。Bhowmik *et al*. (2011) 以 4 個大油菜 (*B. napus*) 品種 (系) 進行花蕾分級試驗，4 個品種 (系) 之最佳出胚花蕾大小分別有 2.0–2.4、2.5–2.9 及 3.5–3.9 mm，顯見同種但不同基因型間其最適培養之花蕾大小存有差異。Prem *et al*. (2008) 以 3 種芥菜 (*Brassica juncea*) 進行 2 種大小花蕾 (2.50–3.00 與 3.05–3.50 mm) 之小孢子培養，結果顯示小孢子的胚分化與基因型有關，且基因型與花蕾大小有顯著的交感作用。推測基因型不止影響花蕾的生長快慢，並影響花蕾內小孢子於每一發育階段停留的時間，最終導致某一特定大小的花蕾含有較高比例之發育階段適

合培養的小孢子。本研究中亦顯示有相同之結果，亦即栽培種、花蕾大小以及這兩因子間的交感作用對胚分化率皆有顯著影響 ($P < 0.01$) (表 1)。

影響小孢子胚分化率的第三個因子為小孢子的培養條件，包括小孢子培養過程中使用的培養基組成、溫度處理、糖濃度處理以及其他添加物等 (Simmonds & Keller 1999)。十字花科蔬菜自油菜建立小孢子培養方法後，大多採用 1/2 或全量 NLN 基本鹽類配方作為小孢子培養液 (Nitsch & Nitsch 1967)。但甘藍類作物不同種或栽培種對於 NLN 鹽類濃度的反應並非完全相同，Da Silva Dias (2001) 比較 1/2 及全量 NLN，以及 Na *et al*. (2011) 比較 1/4、1/2、全量及 2 倍量 NLN 對青花菜小孢子培養的影響，上述兩研究的結果皆顯示以 1/2 NLN 表現最佳。本研究結果亦顯示，「金春」和「新威」兩栽培種使用 1/2 較全量 NLN 具有明顯較高的胚分化率 (表 2)。此外，在活性炭與瓊脂醣懸浮液製作比例方面，本研究使用之 3 種比例組成對胚分化的影響程度差異並不顯著 (表 2)。Gland *et al*. (1988) 指出活性炭在小孢子培養過程中，可吸附一些抑制胚分化或發育的有害物質，有助於胚的正常生長但不會提高胚數。但因直接施用活性炭會對小孢子產生不利的影響，因此發展出以瓊脂醣包覆活性炭的施用方法，避免活性炭直接接觸小孢子，但仍保有吸附不良物質的功能。Da Silva Dias (1999) 於青花菜、花椰菜及葡萄牙甘藍 (*B. oleracea* var. *costata*) 小孢子培養的研究指出，添加活性炭對於 3 種蔬菜的胚分化皆有明顯之提升作用。本研究中 A 組合活性炭與瓊脂醣使用之比例和 Da Silva Dias (1999) 相同 (活性炭：瓊脂醣 = 1.0：0.5)，但使用量增加 (2.0 g：1.0 g vs. 1.0 g：0.5 g)，B 組合 (2 g：2 g) 在活性炭與瓊脂醣之施用量及比例上皆增加，C 組合 (1 g：2 g) 則只在瓊脂醣施用量增加。本研究結果顯示，2 個栽培種以 3 種活性炭與瓊脂醣懸浮液處理之間，胚分化的表現皆無差異 (表 2)，推測 3 種處理中之活性炭與瓊脂醣施用量已能滿足小孢子培養所需，因此增加用量並未產生促進之效果。

培養液中添加之醣類種類及其濃度除提供小孢子營養外，同時影響培養液滲透壓的改變。蔗糖是十字花科作物小孢子培養最常用的一種醣類 (Abraha *et al*. 2008)，但也有報告指出麥芽糖具有更佳的培養效果 (Cristea *et al*. 2013)。Ferrie & Keller (2007) 則以 polyethylene glycol (PEG) 代替蔗糖進行油菜小孢子培養的研究，指出滲透壓是誘導小孢子分化的最主要因素，營養需求則是胚發育後期所需。本研究中使用之 13% 蔗糖與 13% 麥芽糖雖提供相近的滲透壓，但對「金春」和「新威」甘藍的胚形成率而言，13% 蔗糖明顯較 13% 麥芽糖為佳，此結果與大多數使用蔗糖的研究相同，但與 Cristea *et al*. (2013) 所稱麥芽糖優於蔗糖的結果相左。此外，在小白菜 (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) 小孢子培養的研究中顯示，培養初期施以短期較高濃度之蔗糖 (> 13%)，而後將蔗糖濃度予以降低，更能提高小孢子培養之胚形成率 (Lionneton *et al*. 2001)。本研究中，小孢子亦以 16% 蔗糖培養 2 d 後再降至 10% 蔗糖處理，並未能提高胚分化率 (表 3)。推測蔗糖濃度與處理時間的組合仍有改進空間，但實務操作上若蔗糖濃度分為 2 階段處理，則必須增加一次離心步驟，污染的風險亦可能因此而提高。

利用高溫逆境處理誘導小孢子分化，是油菜小孢子培養成功的關鍵因子 (Lichter 1982)。Simmonds & Keller (1999) 觀察到高溫逆境會影響染色體複製分離時微管體的分布，使行使配子體分化路徑的小孢子其細胞內之營養核與生殖核，因高溫逆境的影響由原本不對稱分裂轉為對稱式分裂，從而有利於孢子體的分化。對十字花科作物小孢子的誘導分化而言，一般以 30–35℃處理 1–3 d 後再恢復到室溫培養，可促使小孢子進入胚分化途徑 (Da Silva Dias 2001; Ferrie 2003)，但是依物種及栽培種的不同，小孢子處理最佳的溫度及處理時間仍需加以調整。表 4 結果顯示對「新威」甘藍之小孢子胚分化而言，第一階段高溫處理的影響明顯高於第二階段靜置溫度，因此未來溫度處理會選擇以微調第一階段高溫為主，可對胚分化產生較顯著的提升效果。

小孢子胚分化至子葉期階段時，培養液中之營養已不足以支應胚繼續生長與發育，此

時需將胚取出繼代到固體培養基中，以利後續之發芽。一般子葉期胚之自然發芽比例偏低，以甘藍類而言，胚發芽率在 35–70% 之間 (Babbar *et al*. 2004)。本研究結果顯示，「新威」甘藍子葉期胚的發芽率可達 91.81%，但相同條件下「金春」的發芽率卻僅 27.77% (表 5)，顯示不同栽培種其小孢子胚發芽條件存有很大的差異。對於發芽率偏低的品種，必須藉由各種處理藉以提高其發芽率。過去的研究顯示，子葉期胚利用低溫、脫水或切除子葉等處理有助提高其發芽率 (Gu *et al*. 2004; Zhang *et al*. 2006)。依據本研究在青花菜與花椰菜所建立之小孢子培養技術 (Hsia *et al*. 2017a, 2017b)，將「金春」子葉期胚置於乾燥濾紙上，於 4℃脫水 1 wk 後，再將胚接種於含有不同濃度洋菜之發芽培養基中，促進甘藍發芽 (表 5)。一般而言，培養基中的洋菜濃度越高，培養基中可用之游離水分越少，因此培植體在高滲透壓培養基中亦具有脫水的效果。本研究顯示「金春」甘藍子葉期胚在含有 10–16 g L^{-1} 濃度洋菜之培養基中，發芽率介於 3.33–20.00% 間，但各處理間在統計上的差異並不顯著，原因與各處理內的機差值過大有關 (表 6)。觀察洋菜之濃度不僅影響子葉期胚的發芽率，更影響子葉期胚的成活率，當洋菜濃度增至 16 g L^{-1} 時，子葉期胚的成活率明顯下降，發芽率亦隨之降低。因此，如果只計算成活胚的發芽率 (發芽胚/成活胚)，則可看出以 12 g L^{-1} 處理之 72.72% 發芽率較其他 3 處理 (33.33–42.59%) 之發芽率為高。但若以全體胚數來計算時，則發其芽率只有 20.00%，足見培養基中洋菜濃度對子葉期胚的發芽率與成活率的影響應一併考量 (表 6)。Takahashi *et al*. (2012) 以油菜 (*B. rapa*) 之子葉期胚進行發芽研究，結果顯示子葉期胚在含有 16 g L^{-1} 洋菜之培養基較 8 g L^{-1} 有較高之發芽率，且胚於加有濾紙之 8 g L^{-1} 洋菜培養基中亦較相同洋菜濃度但未加濾紙者為佳，顯示脫水處理有助於胚發芽。本研究與上述研究不同之處在於先將子葉期胚置於濾紙上，在 4℃脫水 1 wk 後，再接種於不同濃度洋菜之發芽培養基，結果顯示洋菜濃度增至 16 g L^{-1} 不僅影響成活率，也會降低發芽率 (表 6)。推測本研究中多重逆境組合 (4℃低溫、脫水、高滲透壓培養基) 雖有利於促進發芽，但卻不利於子葉期胚的成活與生長；而將「金春」子葉期胚直接接種於發芽培養基上於 4℃中培養 1 wk 後，再移至 25℃環境下培養，發芽率可提高到 94% (表 7)，顯著高於先在 4℃置濾紙脫水組或 25℃之對照組，顯示適當而非過度之逆境處理方有助「金春」子葉期胚的發芽。「金春」在調整逆境條件後之發芽率與「新威」(91.8%) 相近，但觀察發芽胚之後續生長有生長停滯現象，根據之前洋菜濃度試驗的觀察，推測此一現象可能與發芽培養基中洋菜濃度過高 (16 g L^{-1}) 不利芽體的後續生長有關。遂將發芽培養基內洋菜濃度降低至 12 g L^{-1} 合併 4℃處理培養 1 wk，發現對「金春」之胚發芽及後續芽體生長具有改善的效果 (資料未顯示)。

小孢子培養過程中，自然產生 2N 植株比率的高低是影響 DH 生產系統效率的重要因子。由小孢子胚分化而來的植株理論上應為單倍體，但由於小孢子培養過程中染色體複製後未分開，或是細胞分裂後隔板未發育，使兩細胞融合等現象發生，導致染色體自然倍加 (Aionesei *et al*. 2005)。由於染色體自然倍加過程係自然發生，因此不同品種在小孢子培養過程中產生 DH 的機率並不相同，例如青花菜 ‘Marathon’ 其 DH 比例達 78%，遠高於其他青花菜品種 (Farnham 1998)；但若個別品種小孢子培養產生 DH 的比例偏低，則需進行人工染色體倍加處理，例如以秋水仙素處理來提高 DH 比例。表 8 顯示「金春」小孢子分化為 DH 的比率為 53.4%；而「新威」DH 僅 12.5%，比率偏低，因此後續將進行秋水仙素處理以提高其 DH 植株比例，結果將另為文詳述之。

綜合本研究結果，針對市售共 14 個甘藍栽培種進行小孢子培養，其中 13 個栽培種有胚分化反應，胚分化率介於 0.05–15.89 個胚/皿之間，但多數栽培種之胚分化率偏低，需進一步優化培養條件。選取其中反應較佳 2 栽培種，就影響小孢子胚分化的重要因子進一步測試，包括花蕾大小 (代表小孢子發育階段)、NLN 鹽類濃度、不同醣類及其濃度，以及高溫逆境處理等。結果顯示，以取自 2.50–3.50 mm 大小之花蕾，培養在含有 13% 蔗糖之 1/2 NLN 培養液中其胚分化最佳，高溫逆境處理

則以32℃處理1 d後，再於25℃中培養對「新威」小孢子胚分化較佳。此外，在子葉期胚發芽方面，「新威」子葉期胚經4℃脫水1 wk後，接種於含有16 g L^{-1} 洋菜的培養基中，發芽率可達91.81%；相同條件下「金春」之胚發芽率僅27.77%。經過調整後將「金春」小孢子胚接種在16 g L^{-1} 洋菜培養基上，置4℃培養1 wk後移至室溫培養，發芽率可提高至94.00%。以流式細胞儀分析「金春」和「新威」DH植株之比例，分別為53.4%和12.5%，顯示不同栽培種之小孢子胚自然倍加比率差異大。本研究之結果可提高目前甘藍小孢子之培養效率，有助未來利用小孢子培養平台生產DH，加速甘藍育種目標的達成。

誌謝

本研究係執行行政院農委會107農科-7.6.5-農-C1(1)計畫之成果。本文稿承農業試驗所花卉研究中心蔡媚婷博士協助審閱，特此申謝。

引用文獻

Abraha, E., M. Klíma, M. Vyvadilová, and M. Bechyně. 2008. Effectiveness of selected antimitotic agents in microspore culture for *Brassica carinata* doubled haploid production. Agricultura Tropica et Subtropica 41:137–149.

Ahmadi, B., K. Alizadeh, and J. A. Teixeira da Silva. 2012. Enhanced regeneration of haploid plantlets from microspores of *Brassica napus* L. using bleomycin, PCIB, and phytohormones. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 109:525–533. doi:10.1007/s11240-012-0119-8

Aionesei, T., A. Touraev, and E. Heberle-Bors. 2005. Pathways to microspore embryogenesis. p.11–34. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry 56-Haploids in Crop Improvement II. (Palmer, C. E., W. A. Keller, and K. J. Kasha, eds.) Springer-Verlag. Berlin, Germany. 318 pp.

Babbar, S. B., P. K. Agarwal, S. Sahay, and S. S. Bhojwani. 2004. Isolated microspore culture of *Brassica*: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. Indian J. Biotechnol. 3:185–202.

Bhowmik, P., J. Dirpaul, P. Polowick, and A. M. R. Ferrie. 2011. A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 106:359–362. doi:10.1007/s11240-010-9913-3

Council of Agriculture. 2019. Agricultural statistics yearbook 2018. http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx (visit on 01/09/2019) (in Chinese)

Cristea, T. O., P. Maria, B. Creola, and B. Marian. 2013. Effect of carbohydrate type over the microspore embryogenesis at *Brassica oleracea* L. Romanian Biotechnol. Lett. 18:8677–8684.

Custers, J. B. M. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). p.185–193. *in*: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.

Da Silva Dias, J. C. 1999. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. Euphytica 108:65–69. doi:10.1023/A:1003634030835

Da Silva Dias, J. C. 2001. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica 119:389–394. doi:10.1023/A:1017563915319

Farnham, M. W. 1998. Doubled-haploid broccoli production using anther culture: Effect of anther source and seed set characteristics of derived lines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:73–77. doi:10.21273/JASHS.123.1.73

Ferrie, A. M. R. 2003. Microspore culture of *Brassica* species. p.205–215. *in*: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.

Ferrie, A. M. R. and W. A. Keller. 2007. Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the *Brassicaceae*. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 43:348–355. doi:10.1007/s11627-007-9053-6

Ferrie, A. M. R. and K. L. Caswell. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 104:301–309. doi:10.1007/s11240-010-9800-y

Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breed. Rev. 25:57–88. doi:10.1002/9780470650301.ch3

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5

García, C. C., M. Nepi, and E. Pacini. 2017. It is a matter of timing: Asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms- A review. Protoplasma 254:57–73. doi:10.1007/s00709-016-0950-6

Germanà, M. A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. Plant Cell Rep. 30:839–857. doi:10.1007/s00299-011-1061-7

Gland, A., R. Lichter, and H. Schweiger. 1988. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. J. Plant Physiol. 132:613–617. doi:10.1016/S0176-1617(88)80264-5

Gu, H. H., W. J. Zhou, and P. Hagberg. 2003. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. Euphytica 134:239–245. doi:10.1023/B:EUPH.0000004945.01455.6d

Gu, H. H., P. Hagberg, and W. J. Zhou. 2004. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Growth Regul. 42:137–143. doi:10.1023/B:GROW.0000017488.29181.fa

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, Y. M. Chou, and T. K. Lin. 2017a. Studies on microspore culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. J. Agric. Res. Taiwan 66:94–104. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06602.02

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, and Y. M. Chou. 2017b. Development of microspore embryogenesis and plant regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*. J. Agric. Res. Taiwan 66:184–192. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06603.02

Keller, W. A., T. Rajhathy, and J. Lacapra. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17:655–666. doi:10.1139/g75-081

Lichter, R. 1981. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. Z. Pflanzenphysiol. 103:229–237. doi:10.1016/S0044-328X(81)80155-9

Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105:427–434. doi:10.1016/S0044-328X(82)80040-8

Lionneton, E., W. Beuret, C. Delaitre, S. Ochatt, and M. Rancillac. 2001. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). Plant Cell Rep. 20:126–130. doi:10.1007/s002990000292

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant. 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Na, H., G. Hwang, J. H. Kwak, M. K. Yoon, and C. Chun. 2011. Microspore derived embryo formation and doubled haploid plant production in broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) according to nutritional and environmental conditions. Afr. J. Biotechnol. 10:12535–12541. doi:10.5897/AJB10.1287

Nitsch, C. and J. P. Nitsch. 1967. The induction of flowering *in vitro* in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. Planta 72:355–370. doi:10.1007/BF00390146

Pratap, A., S. K. Gupta, and Y. Takahata. 2009. Microsporogenesis and haploidy breeding. p.293–307. *in*: Biology and Breeding of Crucifers. (Gupta, S. K., ed.) CRC Press. New York, NY. 385 pp. doi:10.1201/9781420086096.ch15

Prem, D., K. Gupta, G. Sarkar, and A. Agnihotri. 2008. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 93:269–282. doi:10.1007/s11240-008-9373-1

Shariatpanahi, M. E., U. Bal, E. Heberle-Bors, and A. Touraev. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. Physiol. Plant. 127:519–534. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00675.x

Simmonds, D. H. and W. A. Keller. 1999. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. Planta 208:383–391. doi:10.1007/s004250050573

Takahashi, Y., S. Yokoi, and Y. Takahata. 2012. Effects of genotypes and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in several subspecies of *Brassica rapa* L. Plant Biotechnol. Rep. 6:297–304. doi:10.1007/s11816-012-0224-5

Takahata, Y., Y. Takani, and N. Kaizuma. 1993. Determination of microspore population to obtain high frequency embryogenesis in broccoli (*Brassica oleracea* L.). Plant Tissue Cult. Lett. 10:49–53.

Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzuchtg 74:77–81.

Touraev, A., O. Vicente, and E. Heberle-Bors. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends Plant Sci. 2:297–302. doi:10.1016/S1360-1385(97)89951-7

Zhang, G. Q., D. Q. Zhang, G. X. Tang, Y. He, and W. J. Zhou. 2006. Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. Biol. Plant. 50:180–186. doi:10.1007/s10535-006-0004-6

Optimization of Affecting Factors on Microspore Culture in Cabbage

Chi-Ni Hsia[1,*], Uei-Chern Chen[2], Chin-Yi Tsao[3], Tzu-Kai Lin[4], and Ming-Kun Chi[5]

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, T. K. Lin, and M. K. Chi. 2020. Optimization of affecting factors on microspore culture in cabbage. J. Taiwan Agric. Res. 69(3):227–240.

Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) is the most important leafy vegetable in Taiwan. In order to shorten breeding process of F_1 cabbage, an optimized protocol on microspore culture to produce doubled-haploid (DH) lines has been established in this study. Microspores derived from bud with size of 2.50–3.50 mm or 3.51–4.50 mm were compared. Results showed that the smaller-sized buds had either better than or equal to that of the larger-sized buds on embryogenesis among 14 screened cultivars. The results also showed that 13 out of 14 cultivars responded to embryogenesis induction. Moreover, among them 'Jin Chuen' and 'Shin Wei' had the highest microspore embryogenesis with 15.89 embryos/petridish and 10.17 embryos/petridish, respectively. An experiment testing 1/2 or full strength NLN salt medium in combination with active charcoal-agarose suspension on microspore embryogenesis was conducted using cv. 'Jin Chuen' and 'Shin Wei'. The results showed that 1/2 NLN was superior to full strength NLN [Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter (1981)] on microspore embryogenesis in both cultivars. However, no significant effect of charcoal-agarose suspension on microspore embryogenesis was shown. Types of carbohydrate and its concentration in the microspore medium were tested on microspore embryogenesis including either using 13% sucrose or 13% maltose for 4-wk culture interval, or using 16% sucrose for 2 d culturing before changing to 10% sucrose culturing for the rest of time on embryogenesis. The highest embryogenesis rate was found by using 13% sucrose for all culture interval on both cultivars. Two stages temperature treatments on microspore embryogenesis were also investigated by culturing microspores in the first stage at either 32℃ or 35℃ for 1 d followed by culturing either at 22℃ or 25℃ for 2 wk. The results showed that only the high temperature in the first stage had significant effect on embryogenesis and the highest embryogenesis was observed by 1 d culturing at 32℃ following at 25℃ for the rest culturing time. A high embryo germination rate of 91.81% was obtained from 'Shin Wei' by desiccating cotyledon stage embryos on a filter paper at 4℃ for 1 wk before subculturing onto the B5 medium containing 16% agar (B5A-16) for germination. However, a low germination rate of 27.77% was obtained from 'Jin Chuen' by using the same treatment and no improvement on the germination rate was found by increasing agar concentration in the germination medium from 10% to 16%. An improved high germination rate up to 94.00% was obtained on 'Jin Chuen' by directly culturing embryos on the B5A-16 medium without filter paper desiccation at 4℃ for 1 wk before moving to 25℃. Ploidy levels of microspore derived plants were analyzed using flow cytometry and DH rates of 53.4% and 12.5% were obtained for 'Jin Chuen' and 'Shin Wei', respectively.

Key words: *Brassica oleracea*. var. *capitata*, Microspore embryogenesis, Doubled haploid.

Received: February 14, 2020; Accepted: June 30, 2020.
[*] Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[5] Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(3):241–254 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202009_69(3).0006 **研究報告**

咖啡褐眼病之發生及防治藥劑篩選

倪蕙芳[1,*] 林靜宜[2] 吳昭蓉[2]

摘要

倪蕙芳、林靜宜、吳昭蓉。2020。咖啡褐眼病之發生及防治藥劑篩選。台灣農業研究 69(3):241–254。

由 *Cercospora coffeicola* 引起的咖啡褐眼病，主要以 9–12 月為發生高峰期，其中 11 月之罹病度最高。葉片病斑初始為中心白色之針點，漸擴大為褐斑，外圍可能有黃暈出現。當感染果實時，果實上之病徵初始為卵圓型褪色斑，漸擴大為褐斑，有些病斑周圍會有亮紫紅色暈環。本病原菌在葉片上下表皮均會著生叢生孢子梗，下表皮之叢生孢子梗構造多由氣孔產生，上表皮則多位於組織壞疽處。本病原生長溫度為 20–30℃，其中以 25℃為最適生長溫度，胞子於 20–35℃有游離水 6 h 的情況下，可達 90% 左右的發芽率。其中，在 25℃有游離水的情形下，分生孢子於 3 h 即可達到 60% 以上之發芽率，但 10℃及 40℃則不利於發芽。病原菌由葉背侵染時不需傷口，但由葉面侵染時需有傷口存在，果實上之皮孔可能是侵染的自然開口。本菌於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 培養時不易產孢，呈灰黑色菌落，生長緩慢，菌株間之培養形態有差異性，有些會產生紅色色素。選取目前已推薦在咖啡炭疽病防治及未來有可能延伸在咖啡炭疽病使用的藥劑，進行咖啡褐眼病菌菌絲生長及孢子發芽抑制率評估，結果顯示目前推薦在咖啡的殺菌劑僅有百克敏具有同時抑制咖啡褐眼病菌菌絲生長及孢子發芽之能力，得克利僅具有抑制菌絲生長之效果。至於未來可能延伸使用的藥劑，則以扶吉胺具有同時抑制菌絲生長及孢子發芽之能力，而賽普護汰寧僅具有抑制褐眼病菌菌絲生長之效果。以上結果，可供未來咖啡褐眼病防治策略參考。

關鍵詞：咖啡、咖啡褐眼病、藥劑篩選。

前言

咖啡 (*Coffea* spp.) 為茜草科 (Rubiaceae)，咖啡屬 (*Coffea*) 常綠灌木，原產於熱帶非洲。全世界咖啡種植區主要以赤道為中心，南北回歸線之間，在非洲、亞洲、美洲超過 50 個國家種植 (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2018)。台灣咖啡的種植亦已有百年歷史，根據農糧署 2018 年的統計資料顯示 (http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx)，咖啡目前在台灣的收穫量已達 1,018.52 Mg，種植面積達 1,167 ha，收穫面積約 1,151 ha，主要栽培地區依栽培面積大小依序為屏東縣 218.79 ha、南投縣 178.19 ha、台東縣 175.35 ha、嘉義縣 141.18 ha 及高雄市 131.72 ha。其中值得一提的，係 2017 年台灣咖啡種植面積已約為 2008 年 608 ha 的 2 倍，短短 10 年間栽培面積的倍數成長，顯見目前咖啡產業在台灣的重要性及發展趨勢。

隨著咖啡種植面積的增加，咖啡的病蟲害亦受到重視，台灣咖啡的種植與全世界均面臨相同的咖啡果小蠹蟲害問題。咖啡果小蠹的危害所造成的果實傷口，亦可能進一步造成病害的問題。根據美國植物病理學會記錄，共有 33 種由微生物或生理因子造成的咖啡病害 (Waller 1998)，而在台灣植物病害名彙

投稿日期：2020 年 4 月 10 日；接受日期：2020 年 6 月 19 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

紀錄 (Tzeng 2019) 的病害則有由 *Cercospora coffeicola* (Berk & Cooke) 引起的褐眼病 (brown eye spot; BES)、由 *Colletotrichum coffeanum* (F. Noack) 及 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. 引起之炭疽病 (Anthracnose)、由 *Erythricium salmonicolor* (Berk. & Brown) Burds. 引起之赤衣病、由 *Hemileia vastatrix* (Berk. & Broome) 引起之銹病 (Rust, orange or leaf rust)、由 *Rhizoctonia solani* (Kühn) 引起的苗枯病 [Black (seedling) root rot] 及由 *Antennellopsis vulgaris* (W. Yamam.) Bat. & Cif., *Chaetothyrium javanicum* (Zimm.), *Chaetothyrium spinigerum* (Höhn.) W. Yamam. 與 *Scorias communis* (W. Yamam.) 等引起的煤煙病。其中，尤以咖啡銹病、褐眼病及炭疽病為國內外咖啡最重要的病害。本文所探討的咖啡褐眼病為生尾胞菌 *C. coffeicola* [有性世代為 *Mycosphaerella coffeicola* (Cooke)] 所引起，由 Cooke 於 1881 年於牙買加 (Jamaica) 發現，其於 1943 年由 Sawada 在台灣記錄後，後續在國內並無相關詳細的報告。根據 CABI Crop Protection Compendium 資料 (https://www.cabi.org/cpc/datasheet/12204) 顯示，本菌在熱帶及亞熱帶，如亞洲、非洲、北美洲、中美洲、南美洲及大洋洲等均有發生。寄主植物除了阿拉比卡咖啡 (arabica)、盧布斯塔 (robusta) 咖啡、大果 (liberian) 咖啡外，蓖麻 (*Ricinnus communis*) 亦為其寄主 (Souza & Maffia 2011)。病原傳播方式主要依賴其所產生分生胞子，藉由風雨傳播。在咖啡生產大國巴西，此病害是其最重要的病害，若無適當管理，可以造成 30% 以上的產量損失，嚴重時亦會造成落果及後續咖啡豆品質的改變 (De Lima *et al*. 2012; Souza *et al*. 2015; Chaves *et al*. 2018)。一般在育苗床、新植樹或幼年樹發生更為嚴重，台灣大多數咖啡園中均可發現，除了葉片受到危害外，果實亦會受害。本病害在夏威夷的研究中，已知在 20–28℃為最適發病條件，田間維持 36–72 h 的環境濕度下病害發生會更為嚴重。不適宜的栽培環境因子，如植物營養供給不良與營養元素間的不平衡、逆境、遮陰不足、除草劑傷害或根部病害存在下，均會加重本病害的嚴重性 (Nelson 2008)。近年隨著氣候及栽培操作模式的改變，在巴西等地此病害愈發嚴重 (Souza *et al*. 2011)。

咖啡褐眼病的防治，已知可採取的方式有耕作防治與化學防治。耕作防治主要著重於營養源的平衡與控制，已知灌溉水與磷含量之間存在交互作用，導致的氮、鉀、鈣三元素的平衡與此病害的發生息息相關 (Chaves *et al*. 2018; Junior *et al*. 2019)。至於化學防治部分，在夏威夷的研究中顯示開花期開始每月施用 1 次銅劑，共施用 3 次，對此病害具有防治效果 (Nelson 2008)。在國內，並無針對本病害的防治藥劑推薦給農友使用。因此，本研究除針對本病害之病原進行病原特性分析外，並擬就現行已推薦在咖啡炭疽病之亞托敏、得克利、百克敏等藥劑，以及未來可能進行延伸使用之藥劑進行室內藥劑篩選，以提供農友及官方未來進行咖啡褐眼病藥劑推薦時之參考依據。

材料與方法

咖啡褐眼病病害發生調查與病徵觀察

2018 年於嘉義縣中埔鄉無農藥栽培之咖啡園內選定 25 株咖啡樹，每月調查病害發生情形，每株逢機調查上位層枝條 5 枝及下位層枝條 5 枝。每枝條以展開葉開始記錄 10 葉之罹病病斑面積級數，依罹病指數 (disease index) 分別觀察記錄上位層 50 葉、下位層 50 葉之罹病等級及發病情形，並計算罹病度 (disease severity)。罹病等級參考 Souza *et al*. (2015) 之文獻並略加修訂，分為 3 級：0 級為無病徵、1 級為 < 3% 葉片面積出現病斑、2 級為 3–6% 葉片面積出現病斑，3 級則為 > 6% 葉片面積出現病斑，再依照下列公式計算罹病度：罹病度 (%) = Σ (指數 × 該指數罹病葉數)/(3 × 總調查葉數) × 100%。另外，所採集之病葉病斑以解剖顯微鏡 (SMZ 1500, Nikon, Tokyo, Japan)、光學顯微鏡 (Nikon 80i, Tokyo, Japan) 及桌上型掃描式電子顯微鏡 [Scanning Electron Microscope (SEM), TM-1000, Hitachi, Tokyo, Japan] 進行病原體構造之觀察。

病原菌分離與培養

本研究由嘉義縣梅山鄉、阿里山鄉、中埔鄉、雲林縣古坑鄉、南投縣竹山鎮等地咖啡果園中，選取疑似褐眼病之病葉進行病原菌分離。病原分離採行以下兩種方式，第一種為先以漂白水消毒後，繼而以無菌水水洗 3 次，將消毒完成的病葉切取病健部置於以乳酸 (lactic acid) 酸化之potato dextrose agar (PDA) [(acidified PDA; APDA)] 平板上 (pH 3.8)，待菌絲生長後，進行純化培養。第二種為將消毒完成之病葉置於培養皿中保濕，逐日觀察葉片上病徵產胞之情形，當產胞後將孢子塗布於水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上，待菌絲生長後再單孢純化在 PDA 培養基上培養。純化完成之菌株，則移至 WA 培養 2 wk 後，切取菌絲塊，於 10℃下保存於無菌水中。本試驗所使用的 CC-001 及 CC-004 菌株，分別由南投縣竹山鎮桶頭及嘉義縣中埔鄉咖啡園之褐眼病罹病葉組織所分離。另外，試驗所需的分生孢子懸浮液，則為先將測試菌株從保存於無菌水中之菌絲塊移至 PDA 培養基上，25℃光照 4–6 d 後，將孢子以無菌水洗下後，均勻塗布在 9 cm PDA 培養皿中，再置於 25℃光照。4–6 d 後，以 10 mL 無菌水淋洗整個培養皿中所產生之孢子，經兩層紗布過濾後製成孢子懸浮液。

病原菌於咖啡葉之病原性與侵染

將 CC-001 分離株培養於 PDA 7 d 後，以無菌水洗下培養皿內之分生孢子，並以血球計數器 (neubauer assistant improved bright-line hemacytometer, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Germany) 測定孢子濃度。再以無菌水製成孢子懸浮液 (5×10^4 spores mL^{-1})，續將孢子懸浮液離葉接種於咖啡嫩葉上。離葉接種方式如下：分為傷口接種及非傷口接種，將阿拉比卡咖啡健康嫩葉 (葉片剛展開尚未革質化) 由植株取下水洗晾乾後，以滅過菌 3 號蟲針在嫩葉葉背或葉面上製造傷口，將上述以無菌水配製孢子懸浮液 (10^5 spores mL^{-1})，取 20 μL 滴於傷口上。每片葉片於左右兩側各接種一點，各處理 5 片離葉，並以無菌水作為對照組。將接種後葉片保濕於密封塑膠盒中，分別放置於 25℃黑暗之定溫箱中，逐日觀察病斑進展情形。

病原菌型態觀察

將 CC-001 及 CC-004 菌株培養於 PDA 培養基上，置於 25℃培養約 7 d 後，觀察菌落生長型態。待其產孢後，以滅菌之針頭挑取培養基上之分生胞子置於載玻片上，並以干涉位相差顯微鏡 (differential interference contrast; DIC, Nikon 80i, Tokyo, Japan) 進行孢子型態觀察。

溫度對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將 CC-001 及 CC-004 菌株分別移植於 PDA 培養基置於室溫培養 7 d 後，以直徑 0.5 cm 滅菌過之打孔器切取菌絲邊緣，置於 PDA 平板中央，分別置於 10、15、20、25、30、35 及 40℃之定溫箱中黑暗培養。於培養後第 8 天，測量其菌絲生長之直徑，每個處理 5 重複，本試驗重複進行 2 次。另外，將 CC-001 及 CC-004 菌株分別培養於 PDA 培養約 7 d，待其產孢後，以無菌水配製 30 μL (約 200 顆孢子) 之孢子懸浮液，置於 3 凹載玻片上，並將玻片保濕於塑膠培養皿中。分別置於 10、15、20、25、30、35 及 40℃之定溫箱中，黑暗靜置 6 h 後，取出於顯微鏡下計算胞子之發芽情形，每個處理 6 重複，本試驗重複進行 2 次。又為瞭解病原菌在游離水中，胞子發芽所需的時間，本研究另將上述 CC-001 及 CC-004 之孢子懸浮液，以滅菌微量吸管吸取 30 μL (約 200 顆胞子) 之孢子懸浮液，置於 3 凹載玻片之凹槽內。供試載玻片並置於加有 1 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中保濕，將培養皿置於 25℃定溫箱中分別置放 1、2、3、4、5 及 6 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率，每個處理 6 重複。

藥劑對病原菌菌絲生長及孢子發芽之影響

將供試菌株 CC-001 及 CC-004 分別移植至 PDA 培養基，室溫培養 14 d 後，以滅菌過

之打孔器 (孔徑 0.5 cm) 切取菌落邊緣菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所測試的藥劑為目前推薦在咖啡真菌性病害防治之藥劑，藥劑種類如下：25.0% 亞托敏水懸劑 (suspension concentrate; SC) (azoxystrobin，台灣先正達股份有限公司，台灣台北市)、25.9% 得克利水基乳劑 (emulsion, oil in water; EW) (tebuconazole，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、23.6% 百克敏乳劑 (emulsifiable concentrate; EC) (pyraclostrobin，萬得發有限公司，台灣台中市)、39.5% 扶吉胺 SC (fluazinam，台灣石原產業股份有限公司，台灣台北市)、50.0% 三氟敏水分散性粒劑 (water dispersible granules; WG) (trifloxystrobin，台灣拜耳股份有限公司，台灣台北市)、40.0% 克熱淨可濕性粉劑 (wettable powders; WP) (iminoctadine，台灣住友商事股份有限公司，台灣台北市)、62.5% 賽普護汰寧 WG (cyprodinil fludioxonil，台灣先正達股份有限公司，台灣台北市) 等 7 種藥劑，配置成含有效成分濃度為 1、10 及 100 mg a.i. L^{-1} 之 PDA 培養基。另以不添加藥劑之 PDA 培養基作為對照，再將直徑 0.5 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之含藥的 PDA 培養基平板中央，置於 25℃之定溫箱中黑暗培養，於培養後 4 wk 測量其菌絲生長之直徑。每個處理 6 重複，本試驗重複進行 2 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率：抑制率 (%) = {[對照組生長直徑 (cm) − 藥劑處理組生長直徑 (cm)]/對照組生長直徑 (cm)} × 100%。

另外，在藥劑對孢子發芽影響試驗部分，為以滅菌微量吸管吸取 30 μL 上述不同藥劑 (三氟敏、百克敏、亞托敏、得克利、克熱淨、扶吉胺、賽普護汰寧) 之溶液，置於 3 凹載玻片之凹槽內，再以無菌微量吸管吸取 2 μL 供試之 CC-001 及 CC-004 菌株孢子懸浮液 (約 200 spores μL^{-1})，滴於含農藥之載玻片凹槽內，並混合均勻，使凹槽內混合液之藥劑有效成分濃度為分別為 1 及 10 mg a.i. L^{-1}。供試載玻片置於加有 1 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中保濕，將培養皿置於 25℃之定溫箱中。經 6 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率，每個處理 2 皿，6 重複，本試驗重複進行 2 次。以滅菌逆滲透水處理做為對照組。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS Enterprise Guide 7.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

結果

咖啡褐眼病週期調查

咖啡褐眼病發生調查結果顯示，3–4 月與 6–12 月皆可發生，其中以 7–12 月較為嚴重。上層葉罹病高峰期落於 10–12 月，罹病度皆高於 0.8%，其次之罹病小高峰期為 7–8 月，罹病度高於 0.2% (圖 1A)。下層葉罹病高峰期

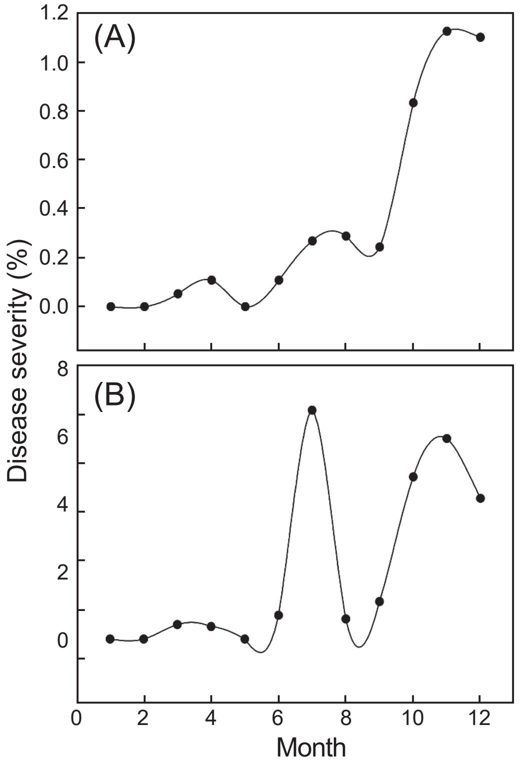

圖 1.　咖啡褐眼病於 (A) 上層葉與 (B) 下層葉之罹病率調查。

Fig. 1.　Disease severity of coffee brown eye spot observed in the branches of the (A) upper and (B) lower layers of canopy of coffee plants.

落於 7 月與 10–12 月，罹病度皆高於 4%，其他月分則零星發生，罹病度皆於 1% 以下 (圖 1B)。

咖啡褐眼病之病徵及病原菌特徵

咖啡褐眼病病斑於葉片之病徵初期可為白色小點斑，周圍褐色 (圖 2A)，病斑擴大後為中心白色、外圍褐色之圓型斑或有輪紋 (圖 2B)，有些病斑外圍黃暈明顯 (圖 2C)，病斑之葉背及葉面均會產生毛狀物 (圖 2D–2E)。將病組織進一步以 SEM 觀察，發現下表皮的分生孢子梗多產生在氣孔上 (圖 3A)，而下表皮的產孢構造則多在壞疽部位 (圖 3B)。鏡檢後，有許多叢生的分生孢子梗產生在上下表皮褐色子座上，此些分生孢子梗為多根簇生，褐色有隔，頂部圓錐形平截 (圖 3C)；分生孢子為倒棍棒形、無色、直立或稍彎曲、頂部近鈍、基部圓錐形平截、有隔膜，隔膜數目不定 (圖 3D)。病原菌若感染果實，初期為淡黃色褪色斑 (圖 4A)，後期則轉為褐色凹陷病斑，病斑外圍可呈現亮紅色外圈 (圖 4B)，其上亦會產生叢生的分生孢子梗於組織壞疽處 (圖 4C)。其次，果實上之病徵亦可以 SEM 觀察到許多分生孢子梗構造。本研究同時觀察了咖啡未成熟果及成熟果，結果發現果實上均有皮孔的存在 (圖 4D)。本研究共收集了 17 株 *C. coffeicola* 菌株，大部分菌株在 PDA 培養時，生長緩慢，不易產孢，大多維持菌絲生長狀態，為橄欖綠近灰黑色菌落，培養菌絲面會有皺褶，背面為黑色 (圖 5A–5B)。有些菌落會有明顯的紅色色素產生 (圖 5C–5D)，此紅色色素的產生在菌株間有明顯差異性存在 (圖 5E–5F)。

咖啡褐眼病菌的病原性測定

將褐眼病菌 CC-001 菌株孢子懸浮液，接種在有傷口的咖啡葉面，逐日觀察病徵表現。結果發現，於接種後 9 d 葉片開始顯現壞疽病斑，然若接種於無傷口之咖啡葉面，則於接種

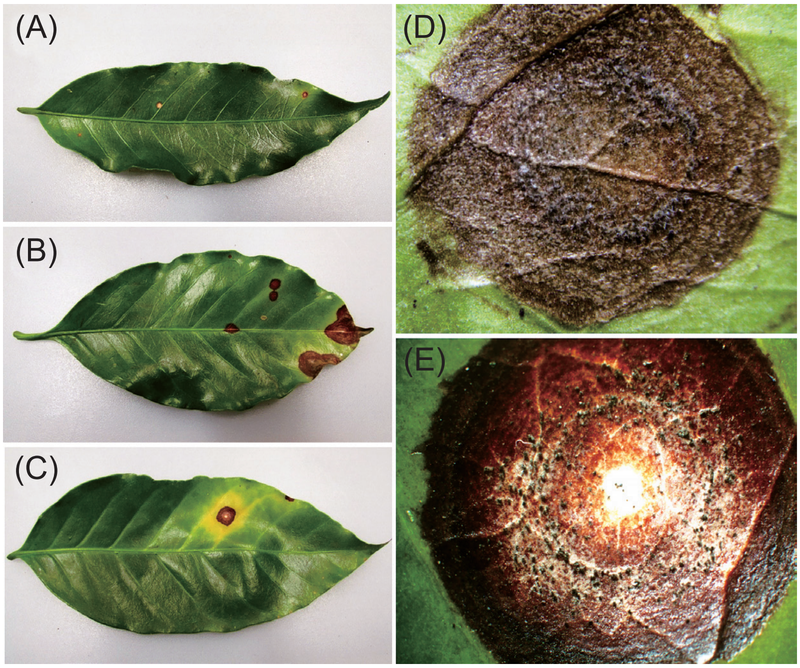

圖 2. 由 *Cercospora coffeicola* 引起的咖啡褐眼病葉片病徵。(A) 為感染的初期小斑點，中間灰白色；(B) 為病斑擴展為褐色癒合斑；(C) 病斑有明顯黃暈，中央明顯灰白色；(D)、(E) 分別為病斑葉背及葉面毛狀物。

Fig. 2. The symptoms and signs caused by *Cercospora coffeicola* on coffee leaves. (A) Tiny spots with ashy center in initial stage; (B) expanded brown lesions merged with each other in middle stage; (C) brown lesions with yellow halo and distinct white center in late stage; and hairy matters on (D) upper and (E) lower surfaces of a lesion.

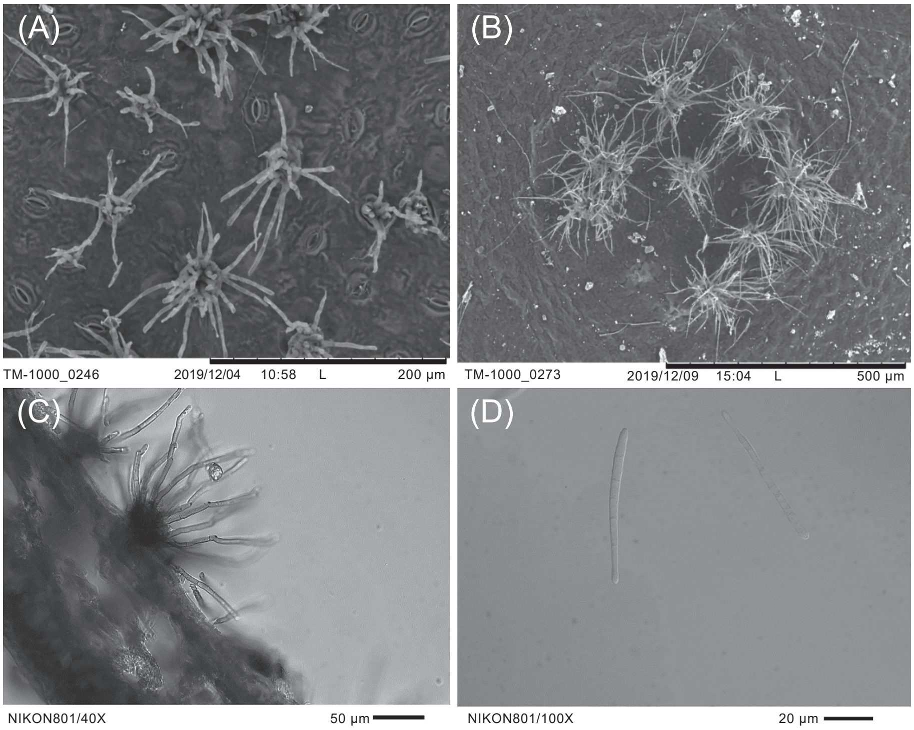

圖 3. *Cercospora coffeicola* 感染咖啡葉之病斑產孢構造及孢子型態。(A) 及 (B) 分別為以 SEM 觀察病斑葉背及葉面。(C) 為以干涉位像差顯微鏡觀察分生孢子梗及 (D) 分生孢子。

Fig. 3. Morphology of *Cercospora coffeicola* on coffee leaves. Scanning electron micrographs (SEM) of sporulation structures on (A) upper and (B) lower sides of leaves. Differential interference contrast micrographs of (C) conidiophores and (D) conidia.

後 12 d 仍無任何病徵顯現。另將孢子懸浮液接種於有傷口之葉背，則於接種後 7 d 開始顯現壞疽病徵。接種於無傷口之葉背時，則於接種後 9 d 開始呈現病徵 (圖 6)，此病徵經過病原分離後仍可分離到 *C. coffeicola*。

溫度對咖啡褐眼病菌菌絲生長及孢子發芽的影響

本研究進行溫度對 CC-001 及 CC-004 菌株菌絲生長之影響，結果如圖 7 所示。兩菌株於皆於 25℃菌絲生長最佳，20℃與 30℃次之，35℃以上及 10℃以下菌絲幾乎不生長。而溫度對褐眼病菌菌株之孢子發芽影響，結果如圖 8 所示。於溫度 10℃及 40℃時，孢子在游離水中 6 h 仍無法發芽，然在 25–35℃含游離水的條件下，均有達 95% 以上的發芽率，在 20℃時 CC-001 的發芽率為 89.63%；CC-004 的發芽率為 93.8%。於 25℃處理下，孢子在游離水中 3 h 之發芽率即可達 60% 以上 (圖 9)，分生孢子於咖啡葉片上之發芽率亦有相同趨勢 (資料未顯示)。

藥劑對咖啡褐眼病菌的生長及孢子發芽的影響

本研究測試三氟敏、百克敏、得克利、克熱淨、扶吉胺、賽普護汰寧及亞托敏等藥劑對 CC-001 及 CC-004 菌株菌絲生長之影響，結果如表 1 所示。在 10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之藥劑培養基中，以百克敏、克熱淨、扶吉胺及賽普護汰寧對菌絲的生長有較佳的抑制效果，抑制率均可達 70% 以上。於 100 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之藥劑培養基中，則除了上述有效藥劑外，得克利亦有 80% 的菌絲生長抑制率。另外，測試藥劑對 CC-004 之孢子發芽的

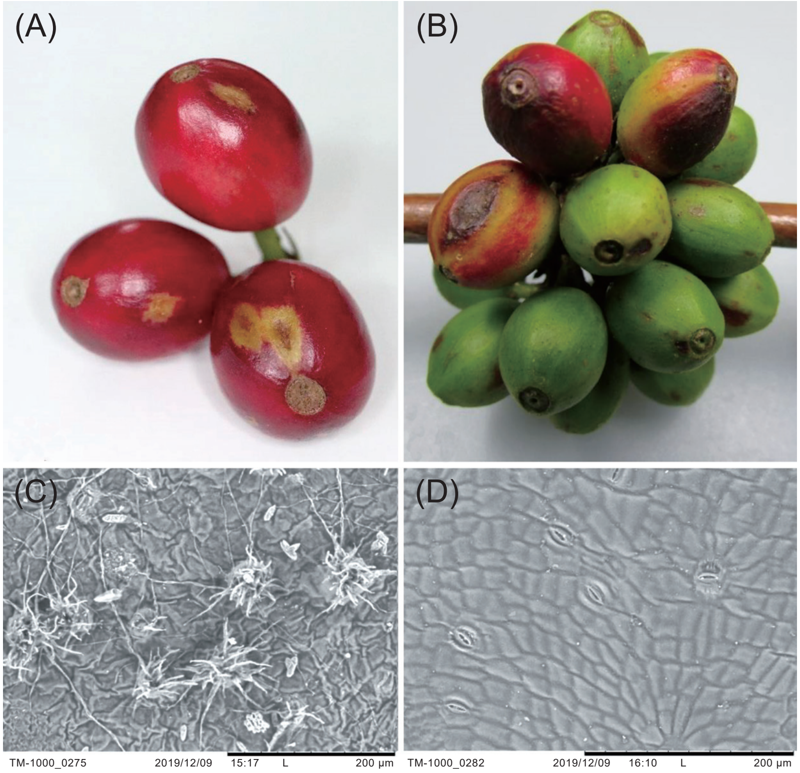

圖 4. *Cercospora coffeicola* 在咖啡果實上造成之病徵。(A) 初期卵圓形褪色斑點；(B) 後期中間病斑壞疽，外圍可能具有紫紅色暈環；(C) 病斑，以 SEM 觀察具有許多叢狀分生孢子梗；(D) 健康咖啡果實具有皮孔。

Fig. 4. The symptoms on coffee berries caused by *Cercospora coffeicola*. (A) Brown oval lesions with ashy centers in initial stage; (B) lesions with purple halo in late infection stage; (C) scanning electron micrograph (SEM) photo of *C. coffeicola* stroma on surface of diseased coffee berries; and (D) SEM photos of lenticels on healthy coffee berries.

影響，結果顯示在 1 mg a.i. L^{-1} 有效濃度處理下，三氟敏、得克利、克熱淨、賽普護汰寧及亞托敏對菌絲發芽完全無抑制作用，有效具有孢子發芽抑制的藥劑僅有百克敏及扶吉胺，其發芽率分別為 11.7% 及 15.5%。當此兩種藥劑提升至 10 mg a.i. L^{-1} 有效濃度下時，其發芽率為 2.7% 及 12.0%，與對照組 99.0% 之發芽率及其他藥劑處理之孢子發芽率具有顯著差異 (表 2)。

討論

咖啡褐眼病為廣泛發生於咖啡產區之真菌性病害，在台灣，台南市東山地區之發生情形為褐眼病全年皆會發生，以 7–9 月明顯有增高趨勢 (Chen 2007)。依據本研究於 2018 年病害發生調查結果顯示，嘉義縣中埔鄉地區之咖啡褐眼病於上半年度 (1–6 月) 零星發生，下半年度 (7–11 月) 則有明顯增高的趨勢，兩者結果相似。此可能與 7–9 月氣溫較高且為雨季，游離水存在的時間較久，有利於分生孢子發芽與侵染有關。至於罹病度與葉片層之相關性，於本研究中所發現的咖啡褐眼病於下層葉發生有較為嚴重的現象，可能與咖啡接近地面之下層葉濕度較高。游離水存在的時間較久，致使病原感染率提升有關，未來可以調查更多的園區以瞭解本病害是否均於下層葉感染較為嚴重，抑或與田間栽培管理如修剪時間、遮陰條件等有關。本研究中，下層葉之罹病高峰期有兩個顯著的高峰點，分別為 7 月與 11 月，罹病度超過 5.8% 以上。分析其原因，可能亦與降水量有關。根據交通部中央氣象局觀測資料查

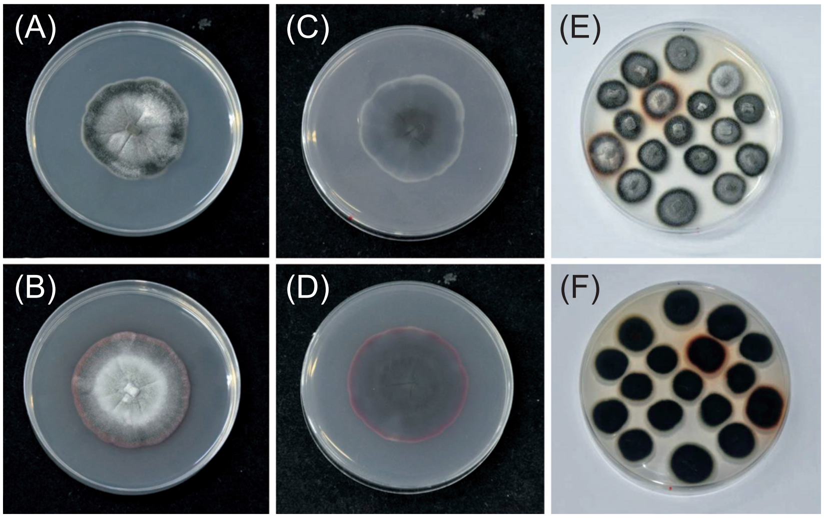

圖 5.　*Cercospora coffeicola* 分離株培養於 PDA 14 d 之型態。(A) 和 (B) 分別是 CC-001 菌株培養於培養基正面與反面；(C) 和 (D) 分別是 CC-005 菌株培養於培養基正面與反面。(E) 和 (F) 分別是 17 株分離株的培養正面與反面。

Fig. 5.　Morphology of *Cercospora coffeicola* isolates on potato dextrose agar (PDA) for 14 d. (A) Upper and (B) lower surface of CC-001; (C) upper and (D) lower surfaces of CC-005; and (E) upper and (F) lower surface of CC-001–CC-017 isolates.

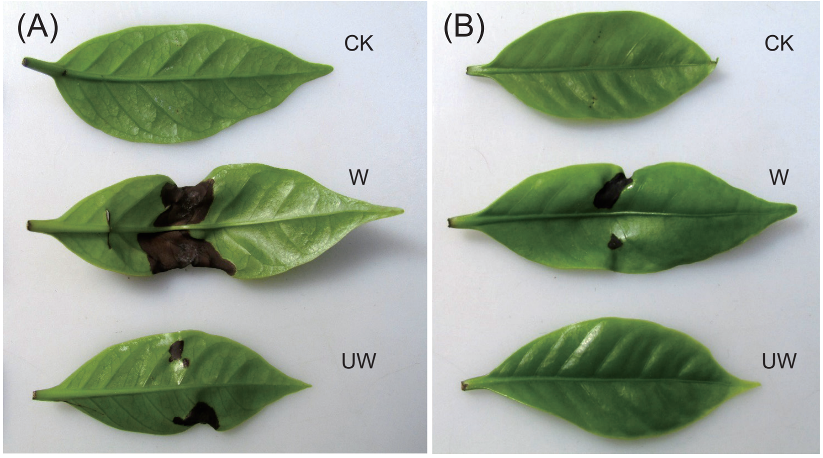

圖 6.　*Cercospora coffeicola* 接種在咖啡葉 12 d 之病徵。(A) 葉背接種 CC-001 菌株孢子懸浮液；(B) 葉面接種 CC-001 菌株孢子懸浮液。CK：接種無菌水對照；W：傷口接種；UW：非傷口接種。

Fig. 6.　Pathogenicity of *Cercospora coffeicola* isolate CC-001 on coffee leaves. Symptoms on (A) lower surfaces and (B) upper surface 12 d post inoculation. W: wounded inoculation; UW: unwounded inoculation; and CK: inoculated with distilled water.

詢系統 (http://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp) 之年報表顯示，中埔地區 8 月的月降水量高達 921 mm，其中最大日降水量為 384 mm，表示約 41% 之月降水量集中於 1 d 落下。此強降雨可能造成罹病葉容易被打落，而下層葉之罹病度明顯較上層葉高，導致下層葉落葉情形更為嚴重。本研究之 8 月病害調查日，是在此強降雨日之後進行，因此 8 月

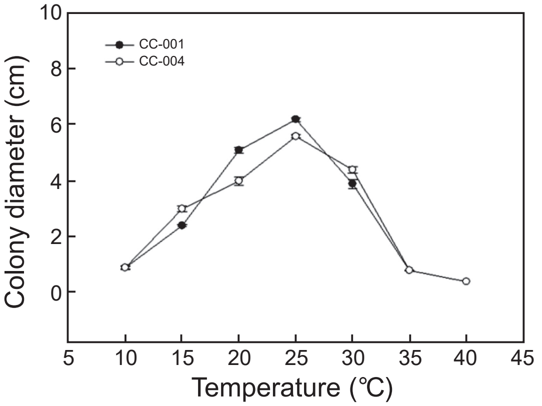

圖 7. 溫度對 *Cercospora coffeicola* 菌絲生長之影響。● ○ 分別表 CC-001 菌株及 CC-004 菌株培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar; PDA) 培養基 21 d。

Fig. 7. Mycelia growth of *Cercospora coffeicola* CC-001 and CC-004 isolates on potato dextrose agar (PDA, Difco, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) for 21 d under different temperatures.

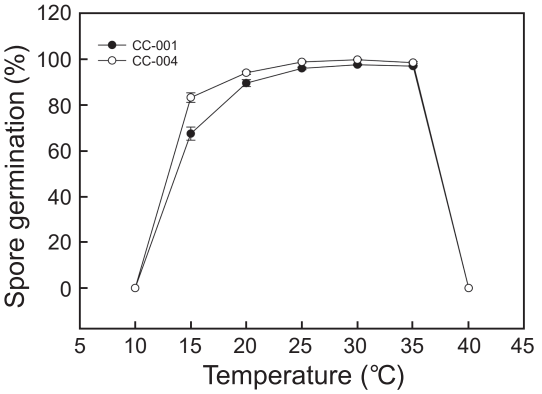

圖 8. 溫度對 *Cercospora coffeicola* CC-001 and CC-004 分離株孢子發芽之影響。

Fig. 8. Spore germination ratio of *Cercospora coffeicola* isolates CC-001 and CC-004 under different temperatures.

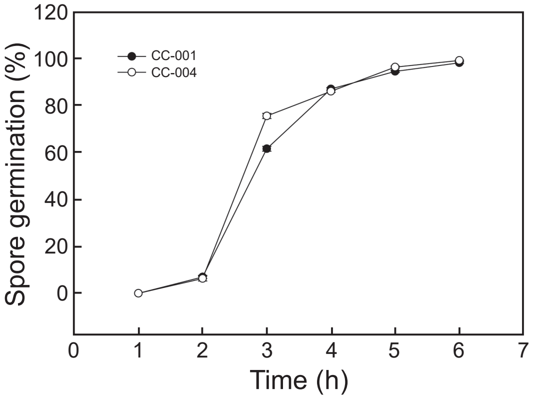

圖 9. *Cercospora coffeicola* CC-001 and CC-004 分生孢子在 25℃含游離水中之發芽時間。

Fig. 9. The spore germination ratio of *Cercospora coffeicola* isolates CC-001 and CC-004 on free water under 25℃ with different time spans.

之下層葉罹病度與 7 月相較快速滑落，而上層葉 7–8 月之罹病度並無明顯差異。9 月之後降水量趨緩，病原菌再次循環感染，因此造成下層葉之罹病高峰期有兩個高峰。

本研究於進行咖啡褐眼病菌組織分離時，顯示利用常用的组織分離法並不易分離到 *C. coffeicola*，其原因為咖啡葉內存在極多的內生菌，而 *C. coffeicola* 在人工培養基上生長極為緩慢，容易被其他生長較快存在於病斑上的腐生真菌或內生真菌覆蓋。已有研究顯示，咖啡葉內存在 16 屬、17 種以上的內生真菌，其中又以 *Colletotrichum* 及 *Phyllosticata* 之存在最為普遍 (Oliveira *et al*. 2014)。而 *Colletotrichum* 為生長較為快速的真菌，因此利用組織分離法常先分離到內生菌 *Colletotrichum*，導致 *Cercospora* 無法正常生長。經利用病斑消毒後保濕，待其產孢後再行單孢分離，可以較精準的獲取 *Cercospora* 病原菌，避免受到內生菌的干擾。

本研究在田間亦觀察到有些褐眼病病斑外圍黃暈不明顯，病徵進展慢，有些病斑則進展快，黃暈明顯，造成落葉，此與病原菌毒質之產生有關。已知 *Cercospora* 真菌具有產生植物真菌毒質 (頭孢菌素，cercosporin) 之能力，cercosporin 為寄主非專一性毒質，屬於光激活的毒質，藉由產生活性氧物質 ($^1O_2$: O_2^-)，造成生物細胞膜脂質過氧化作用進而造成細胞的死亡，對許多生物均有害。在人工培養時，此毒質會結晶在菌絲體周圍及培養基表面，並呈現紅色，此毒質之產生量受到溫度、光照及營養之影響 (Daub & Chung 2007)。不同分離株其產生毒質之能力亦有差異性，此毒質產生之能力已知與病原性相關。Souza *et al*. (2012)

表 1. 殺菌劑對 *Cercospora coffeicola* CC-001 與 CC-004 分離株菌絲生長之影響。

Table 1. Fungicide effect on mycelial growth of *Cercospora coffeicola* CC-001 and CC-004 isolates after 14 d of treatment.

	Mycelial growth inhibition (%)[z]					
	1 mg a.i. L^{-1}		10 mg a.i. L^{-1}		100 mg a.i. L^{-1}	
Treatment	CC-001	CC-004	CC-001	CC-004	CC-001	CC-004
50.0% trifloxystrobin WG[y]	64.6 b[x]	63.0 c	61.1 d	61.8 c	44.3 f	62.7 e
23.6% pyraclostrobin EC	77.7 a	78.0 a	77.0 b	74.1 ab	75.1 d	79.0 c
25.9% tebuconazole EW	42.9 c	41.5 d	61.3 d	62.7 c	83.3 b	85.0 a
40.0% iminoctadine WP	45.8 c	44.2 d	72.4 c	73.0 b	80.5 bc	81.0 bc
39.5% fluazinam SC	71.1 ab	73.0 b	78.4 b	78.7 a	78.2 cd	80.1 c
62.5% cyprodinil + fludioxinil WG	62.9 b	66.5 c	86.2 a	73.8 b	88.0 a	82.7 b
25.0% azoxystrobin SC	63.5 b	62.5 c	59.3 d	65.5 c	70.3 e	72.2 d
LSD	8.7	4.7	3.6	4.9	3.4	2.1

[z] Inhibition (%) = [(diameter of mycelial growth on PDA without fungicide − diameter of mycelial growth on PDA with fungicide)/ diameter of mycelial growth on PDA without fungicide] × 100%. PDA: potato dextrose agar.
[y] WG: water dispersible granules; EC: emulsifiable concentrate; EW: emulsion, oil in water; WP: wettable powders; and SC: suspension concentrate.
[x] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

表 2. 殺菌劑對 *Cercospora coffeicola* CC-001 與 CC-004 分離株胞子發芽之影響。

Table 2. Fungicide effect on spore germination of *Cercospora coffeicola* at 25℃ after 6 h of incubation.

	Spore germination (%)[z]			
	1 mg a.i. L^{-1}		10 mg a.i. L^{-1}	
Treatment	CC-001	CC-004	CC-001	CC-004
50.0% trifloxystrobin WG[y]	97.2 b[x]	97.7 a	96.0 b	96.8 b
23.6% pyraclostrobin EC	14.0 d	11.7 c	0.0 e	2.7 e
25.9% tebuconazole EW	99.0 ab	99.2 a	98.7 a	98.5 ab
40.0% iminoctadine WP	99.5 a	98.5 a	80.7 c	75.0 c
39.5% fluazinam SC	11.8 e	15.5 b	5.5 d	12.0 d
62.5% cyprodinil + fludioxinil WG	97.7 ab	97.7 a	96.0 b	97.0 b
25.0% azoxystrobin SC	93.8 c	98.8 a	93.7 b	97.7 ab
CK[w]	99.7 a	99.0 a	99.7 a	99.0 a
LSD	2.0	2.3	2.6	1.8

[z] Spore germination (%) = (no. of spore germinate on water with fungicide/100 spores).
[y] WG: water dispersible granules; EC: emulsifiable concentrate; EW: emulsion, oil in water; WP: wettable powders; and SC: suspension concentrate.
[x] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.
[w] CK: control check, treated with distilled water.

曾比較 60 株 *C. coffeicola* 分離株之菌絲生長、毒質產生及產孢能力，結果發現菌株間確實存在極大的差異性，而溫度亦影響毒質的產生情形。此外，毒質產生與否已知亦與 *Cercospora* 病原菌的病原性強弱有關 (Almeida *et al.* 2005; Choquer *et al.* 2005)。由本研究所收集的 17 株 *C. coffeicola* 分離株在 PDA 培養基產生紅色色素之結果，發現目前所收集之分離株僅有 2 株產生些許紅色色素，其餘分離株均無產生。此是否顯示台灣的 *C. coffeicola* 產生毒質之能力較國外分離株低，導致本病害在國內咖啡園造成之影響未如巴西等國家造成 30%

以上的損失，此仍有待收集更多的菌株證明。由於本毒質為光激活之毒質，因此咖啡種植在遮陰的環境下會降低褐眼病菌的病勢進展，病斑產生情形亦較輕微 (Nelson 2008)。本研究利用掃描式電子顯微鏡觀察病斑上病原菌之產胞情形，結果發現，葉背的叢生孢子梗大多由氣孔鑽出，而葉面則大多在壞疽病斑處。因此，本病害若進行藥劑防治時，務必能夠進行葉面及葉背的噴施，以達完全防治之效果。在本試驗接種試驗中，以 SEM 檢視菌絲侵入情形發現，有些菌絲從氣孔侵入，但未看到有附著器產生，並無直接侵染的證據。此與 Souza *et al*. (2011) 所得到的結果相似，至於從葉面感染的可能性，過去曾有報告其可能會由葉面直接侵入感染 (Gaitán *et al*. 2015)，然由本研究發現葉面若無傷口，則病原菌並不易侵染造成病徵，且完全無看到本菌有任何附著器產生，無直接感染的證據。其次，本研究於 SEM 下尚發現咖啡果實具有皮孔，此皮孔是否為褐眼病菌侵染果實之自然開口，則需進一步證明。此外，本研究發現葉面在有傷口的情形下，病原菌於接種後 9 d 會造成葉片病徵，然若無傷口，則至接種後 12 d 仍無病徵出現。顯示葉面傷口的存在，會增加病原感染植株的機率，而葉背傷口的存在同樣會加速病害的發生，因此咖啡栽培亦應注意整枝修剪，避免擦壓傷。另控制昆蟲的危害等，則可避免葉片及果實傷口的產生。

由於咖啡褐眼病目前並無推薦藥劑，因此本研究為提供農友適當防治藥劑，先根據目前已推薦於咖啡炭疽病之藥劑及未來可能可以延伸的藥劑進行篩選。結果發現，僅百克敏對咖啡褐眼病菌具有菌絲生長及抑制孢子發芽的能力。百克敏為 FRAC C3 電子傳遞過複合體 III 泛醇氧化酶 (ubiquinol oxidase) Qo 位置抑制劑，化學歸類為甲氧基胺基甲酸脂類 (methoxycabamates)，藥劑具有穿層滲透效果，可從葉面滲透至葉背 (Tzeng 2015)。以本菌會於上下表皮形成叢生孢子梗而言，此類具有穿層滲透的藥劑應具有較佳的防治效果。然此類藥劑為抗藥性高度風險，需進行抗藥性管理，在同一生長季避免多次使用。本研究另外測試了同類型的藥劑三氟敏及亞托敏，結果發現亞托敏及三氟敏對本菌的菌絲生長抑制及孢子發芽抑制效果均不佳。因此，以目前推薦在防治咖啡炭疽病的史托比類推薦藥劑而言，應只有百克敏具有防治咖啡褐眼病之效果。得克利作用機制為 FRAC G1 固醇類生合成過程去甲基化酶抑制劑，化學歸類為 Triazoles 類，系統性保護兼治療效果之藥劑，本藥劑目前亦為咖啡炭疽病防治之推薦藥劑。室內試驗結果顯示，得克利具有抑制咖啡褐眼病菌菌絲生長的作用，但不具有抑制孢子發芽之作用。Triazoles 殺菌劑，在國外亦有推薦在咖啡褐眼病防治上，惟本研究顯示不具有抑制 *C. coffeicola* 孢子發芽之用，因此不建議在雨季來臨前作為本病害之保護性藥劑使用。為了增加防治咖啡褐眼病藥劑之選擇性，本研究根據公告修正農藥田間試驗準則第 4 條第 1 項第 2 款延伸使用範圍之群組化作物或有害生物種類、代表性使用範圍及其實施方式 (https://pesticide.baphiq.gov.tw/web/NewsDetailViews2.aspx?news_sn=1494) 評估了在咖啡炭疽病防治上具有延伸潛力的藥劑，如克熱淨、扶吉胺及賽普護汰寧等藥劑對咖啡褐眼病之菌絲生長及孢子發芽抑制效果評估。克熱淨屬 FRAC M 非專一性多點接觸，為 guanidines 類藥劑，屬於烷苯磺酸鹽，可影響細胞膜與脂質合成 (Tzeng 2015)。本研究結果顯示，本藥劑以 10 mg a.i. L^{-1} 有效濃度添加在培養基中可抑制咖啡褐眼病菌菌絲生長，但對孢子的發芽抑制效果不佳，顯示本藥劑不適合做為本菌雨季來臨前孢子發芽抑制使用。扶吉胺作用機制為 FRAC C5 氧化磷酸化作用解偶聯劑，化學歸類為二硝基苯胺類 (2,6-dinitroanlines)，為廣用途殺菌劑，稍具系統移行與治療特性，抗雨性及殘效性佳兼具殺螨之效果 (Tzeng 2015)。本研究結果中顯示，此藥劑對於咖啡褐眼病菌之菌絲生長及孢子發芽均有極佳的抑制效果，未來可優先進行延伸使用。賽普護汰寧為賽普洛及護汰寧 (fenpiclonil) 混合性藥劑，護汰寧為 FRAC E2 phenylprrroles 苯吡咯類藥劑，非系統性，主要為干擾孢子發芽，次為影響菌絲生長。賽普洛為 FRAC D 類藥劑，主要為胺基酸

與蛋白質生合成作用抑制劑，具系統性，葉部吸收後可向上移行 (Tzeng 2015)。本研究發現賽普護汰寧處理之咖啡褐眼病菌孢子發芽率仍高達 99%，但於 100 mg a.i. L^{-1} 有效濃度處理下對菌絲生長可達 80% 以上之生長抑制率，顯示賽普護汰寧對於咖啡褐眼病菌僅具有菌絲生長抑制效果。綜合以上藥劑試驗結果，顯示目前咖啡的推薦藥劑中，建議雨季來臨前噴施百克敏防治咖啡褐眼病菌孢子之發芽，雨季後可以噴施得克利抑制菌絲的生長。未來可考慮延伸扶吉胺及賽普護汰寧兩藥劑，以增加不同殺菌機制藥劑之使用，減少田間抗藥性的產生。這些藥劑的使用，除可防治褐眼病外，亦可兼防炭疽病。

由於咖啡褐眼病的發生與田間栽培管理模式極為相關，因此有必要採取咖啡褐眼病綜合防治策略。首先維持咖啡植株適當營養相當重要，咖啡植株於氮肥及鉀肥缺乏的情形下會加重本病害發生，因此建議定期咖啡樹組織及土壤進行營養成分分析。但是，過多的氮肥並不建議，因為本病害較易感染新梢，氮肥太多導致新梢過多會加重其感病程度。此外，加強田間衛生，去除罹病病葉及果實殘體，移除田間。再者，維持樹勢良好、減少植株受到乾旱、營養及病蟲害等逆境病害、維持良好排水，避免根系腐敗、降低除草劑傷害等，特別是嘉磷賽 (glyphosate) 類除草劑的危害，亦可以維持植株良好抗病性。由於 *Cercospora coffeicola* 產生之毒質屬於光激活毒質，因此維持咖啡樹 35–65% 的遮陰，可以減緩毒質產生，降低病害嚴重度。又避免上方噴灌、迴避在植株仍有水分或露水時工作、適當修剪增加通風，則均可避免孢子的傳播及感染。最後，適度使用殺菌劑，保護新生葉也有效果。在夏威夷防治此病害的殺菌劑為銅劑，建議在乾燥氣候無風時施用，大約開花後每個月施用一次。銅劑為保護性藥劑，因此施用原則一定要覆蓋整棵樹的新生葉片，方能具有保護效果 (Nelson 2008)。

綜合言之，咖啡褐眼病之防治可採行田間管理，控制鉀肥施用、進行遮陰，必要時使用適當藥劑防治，避免早期葉片及果實的感染造成落葉及果實炭疽病菌之二次危害，影響產量及咖啡豆品質。若能進行早期保護，即使在果實近採收期受到本菌的感染，對產量及品質影響亦不至於產生巨大的影響，影響農友收益。

誌謝

本研究承行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所園藝系張淑芬博士、植物保護系王泰權助理研究員提供咖啡試驗材料，以及許淑麗、賴素玉、陳幸葵等三位小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Almeida, Á. M. R., F. F. Piuga, S. R. R. Marin, E. Binneck, F. Sartori, L. M. Costamilan, M. R. O. Teixeira, and M. Lopes. 2005. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. Fitopatol. Bras. 30:594–602. doi:10.1590/S0100-41582005000600005

Chaves, E., E. A. Pozza, H. S. Neto, G. B. Vasco, G. A. Dornelas, A. A. A. Pozza, and M. S. Scalco. 2018. Temporal analysis of brown eye spot of coffee and its response to the interaction of irrigation with phosphorous levels. J. Phytopathol. 166:613–622. doi:10.1111/jph.12723

Chen, F. J. 2007. Preliminary survey of pests and diseases of coffee at Dong-Shan area and screening of agrochemicals for rust. Master Thesis, Department of Biotechnology, National Kaohsiung Normal University. Kaohsiung, Taiwan. 72 pp. (in Chinese with English abstract)

Choquer, M., K. L. Dekkers, H. Q. Chen, L. Cao, P. P. Ueng, M. E. Daub, and K. R. Chung. 2005. The *CTB1* gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. Mol. Plant Microbe. Interact. 18:468–476. doi:10.1094/ MPMI-18-0468

Daub, M. E. and K. R. Chung. 2007. Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Cercosporin.aspx (visit on 02/20/2020)

De Lima, L. M., E. A. Pozza, and F. Da Silva Santos. 2012. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. J. Phytopathol. 160:209–211. doi:10.1111/j.1439-0434.2012.01879.x

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Crops. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC (visit on 02/20/2020)

Gaitán, A. L., M. A. Cristancho, B. L. Castro Caicedo, C. A. Rivillas, and G. C. Gómez. 2015. Compendium of Coffee Diseases and Pests. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 79 pp.

Junior, M. P. B., E. A. Pozza, H. S. Neto, M. de Lourdes Oliveira e Silva, A. A. A. Pozza, R. J. Guimarães, and P. E. de Souza. 2019. Brown eye spot in coffee subjected to different drip irrigation and fertilization management. Australas. Plant Pathol. 48:245–252. doi:10.1007/s13313-019-0623-y

Nelson, S. C. 2008. Cercospora leaf spot and berry blotch of coffee. https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-41.pdf (visit on 02/25/2020)

Oliveira, R. J. V., R. G. Souza, T. E. F. Lima, and M. A. Q. Cavalcanti. 2014. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. Mycosphere 5:523–530. doi:10.5943/mycosphere/5/4/4

Souza, A. G. C. and L. A. Maffia. 2011. First report of *Cercospora coffeicola* causing Cercospora leaf spot of castor beans in Brazil. Plant Dis. 95:1479. doi:10.1094/PDIS-05-11-0399

Souza, A. G. C., F. Á. Rodrigues, L. A. Maffia, and E. S. G. Mizubuti. 2011. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. J. Phytopathol. 159:6–11. doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01710.x

Souza, A. G. C., L. A. Maffia, and E. S. G. Mizubuti. 2012. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. J. Phytopathol. 160:540–546. doi:10.1111/j.1439-0434.2012.01947.x

Souza, A. G. C., L. A. Maffia, F. F. Silva, E. S. G. Mizubuti, and H. Teixeira. 2015. A time series analysis of brown eye spot progress in conventional and organic coffee production systems. Plant Pathol. 64:157–166. doi:10.1111/ppa.12250

Tzeng, D. S. 2015. Agrochemistry of Pesticide and Its Application. National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 176 pp. (in Chinese)

Tzeng, S. S. 2019. List of Plant Disease in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 311 pp. (in Chinese)

Waller, J. M. 1998. Diseases of coffee (*Coffea arabica* L.- arabica coffee) (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner- robusta coffee). https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Coffee.aspx (visit on 02/20/2020)

Etiology and Fungicide Screening of Coffee Brown Eye Spot Disease

Hui-Fang Ni[1,*], Ching-Yi Lin[2], and Chao-Jung Wu[2]

Abstract

Ni, H. F., C. Y. Lin, and C. J. Wu. 2020. Etiology and fungicide screening of coffee brown eye spot disease. J. Taiwan Agric. Res. 69(3):241–254.

Coffee brown eye spot disease, caused by *Cercospora coffeicola*, mainly occurred between September and December and reached its peak period in November. In the initial stage, needle spots with ashy centers appeared on coffee leaves. The spots expanded with gradually visible yellow halo. On berries, ashy oval spots grew and became brown lesions, and some lesions had bright purple halo. The pathogen produced aggregated conidiophores both on upper and lower sides of coffee leaves. The aggregated conidiophores were produced from stomata on lower side of leaves. On upper side, conidiophores appeared on the lesions. The pathogen grows in the range of 20–30℃, and 25℃ is the optimal growth temperature. After 6 h of incubation in 20–35℃, the spore germination ratio was 90%. With free water at 25℃, the spore germination ratio reached 60% in 3 h. Spore germination was inhibited under 10℃ and above 40℃. No wound was needed when the pathogen invaded from the lower sides of leaves. However, wounding was necessary for infection on the upper side of leaves, and lenticels on berries might be a possible path for invasion. The pathogen was hardly sporulated on potato dextrose agar (PDA), and the colony was gray-black and grows slow. Some isolates secreted red pigment on PDA. Using recommended fungicides and fungicides with potential to become extended recommended chemicals, the fungicide screening tests were conducted. The results showed that, among the recommended fungicides, Pyraclostrobin inhibited mycelial growth and spore germination at the same time. Instead, Tebuconazole inhibited mycelial growth only. For fungicides with potential to become extended recommended chemicals, Fluazinam inhibited both mycelial growth and spore germination, and cyprodinil + fludioxinil was only effective on mycelial growth. The above results might provide the information for controlling coffee brown eye spot disease.

Key words: Coffee, Coffee brown eye spot disease, Fungicide screening.

Received: April 10, 2020; Accepted: June 19, 2020.

[*] Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw
[1] Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 69(3):255–263 (2020)
DOI:10.6156/JTAR.202009_69(3).0007

應用電動推剪及旋風分離法收穫基徵草蛉 [*Mallada basalis* (Walker)] 卵粒

許北辰[1] 董耀仁[1] 余志儒[2] 林鳳琪[3] 江明耀[1,*]

摘要

許北辰、董耀仁、余志儒、林鳳琪、江明耀。2020。應用電動推剪及旋風分離法收獲基徵草蛉 [*Mallada basalis* (Walker)] 卵粒。台灣農業研究 69(3):255–263。

基徵草蛉 [*Mallada basalis* (Walker)] 在台灣為農業害蟲的重要天敵。基徵草蛉的卵粒以卵柄 (egg stalks) 結構附著於平面介質，使卵粒限制於平面分布，耗費收穫人力及占用運送空間，且造成試驗無法大量操作，也增加田間應用的困難度。本研究提出以電動推剪搭配旋風離心器切斷草蛉卵柄並收獲草蛉卵粒，與傳統次氯酸鈉法處理組相較，卵收穫率 (90.2% ± 0.6% vs. 80.0% ± 2.3%)、卵孵化率 (80.8% ± 2.8% vs. 70.0% ± 3.6%) 及成蟲獲得率 (54.2% ± 3.4% vs. 46.7% ± 4.1%) 皆以電動推剪搭配旋風離心器者較佳。兩處理間雖無顯著差異，惟以推剪搭配旋風離心器收獲草蛉卵粒具有速度快、器械體積小、操作便利及安全性高等優點，具有應用於小型之草蛉卵收獲系統之潛力。

關鍵詞：基徵草蛉、卵柄、收穫、推剪、大量飼養。

前言

基徵草蛉 [green lacewing; *Mallada basalis* (Walker)] 屬脈翅目草蛉科 (Neuroptera: Chrysopidae)，其成蟲為植食性，以花蜜、花粉等為食 (Wu 1995)，幼蟲則為肉食性，係蚜蟲、粉蝨、葉蟎等小型害蟲的天敵 (Lee 1994; Wu 1995; Lu & Wang 2006; Chang & Lu 2007; Chen *et al*. 2014; Hsu & Lu 2020)，且可利用人工飼料來大量繁殖 (Cohen 1983; Ma *et al*. 1986; Lee 1994; Ye *et al*. 2017; Hsu & Lu 2020)。應用於農業害物綜合管理 (integrated pest management; IPM)，推薦施放基徵草蛉於如木瓜、草莓、瓜類和茄科等作物，防治如棉蚜 (*Aphis gossypii* Glover)、橘球粉介殼蟲 [*Nipaecoccus filamentosus* (Cockerell)]、銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring)、潛葉蛾 (*Phyllocnistis citrella* Stainton)、神澤氏葉蟎 (*Tetranychus kanzawai* Kishida) 及二點葉蟎 (*Tetranychus urticae* Koch) 等重要害蟲 (Wu 1992; Chang & Huang 1995; Wu 1995; Lu & Wang 2006; Cheng *et al*. 2010; Chen *et al*. 2014)。

基徵草蛉產卵時，會先以腹部末端於基質表面產生一卵柄 (egg stalk) 構造，再將卵粒附著於物體表面 (圖 1)。草蛉種間之卵柄結構各有不同，此卵柄多為醛類 (aldehyde) 聚合物，其物理結構及氣味成分可在卵孵化前防禦如螞蟻等天敵，或降低同種間自殘的機率 (Eisner *et al*. 1996)。

應用草蛉防治害蟲時，為達淹沒性釋放 (inundative release)，需要快速且均勻的釋放大量卵粒或幼蟲 (Wu 1995; Lu & Wang 2006; Cheng *et al*. 2010; Chen *et al*. 2014)。草蛉卵被卵柄黏附於產卵標的上，應用於葉菜類等低

投稿日期：2019 年 10 月 30 日；接受日期：2020 年 6 月 3 日。
* 通訊作者：mingyaw@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所應用動物組研究員。台灣 台中市。

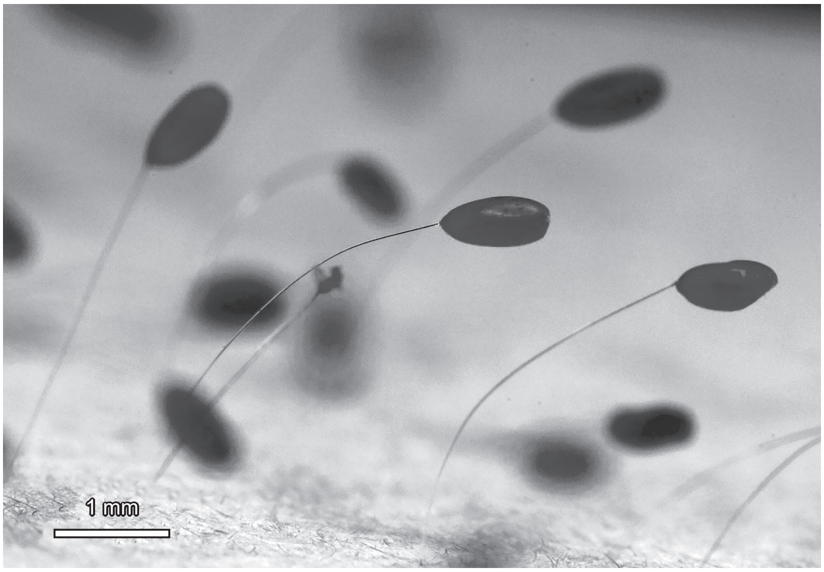

圖 1. 基徵草蛉卵粒藉由卵柄附著於平面，卵柄容易因卵粒的重量而向地面彎曲。

Fig. 1. The eggs of *Mallada basalis* are attached to the plane by the egg stalk, which is easy to bend to the ground due to the weight of the egg.

矮作物時，無法直接以噴布器械散布卵粒，只能將黏附卵粒之紙張拆解為小單張，再將紙張以鐵線、塑膠繩或釘書針等懸掛於田間植株 (Lu & Wang 2006; Cheng *et al*. 2010; Chen *et al*. 2014)。此舉除造成紙張於田間發霉 (Chen *et al*. 2014)，若遇如茄科、瓜科等離地較高的作物，甚至需要各別懸掛，過程耗時耗力，影響農戶的使用意願。卵柄結構亦使卵粒無法集中，當需要做集中操作滯育 (diapause) 或卵期延長 (delayed hatching) 時會降低操作效率 (Bezerra *et al*. 2014)。此外，卵粒被卵柄結構限制於單一維度的平面分布，運送卵粒時為避免損傷，須將紙張設置為立體結構且連帶運送，耗費包裝人力，也消耗載送空間。若可將草蛉卵粒有效率地收穫、集中，可減少商品儲藏空間、降低運輸成本，以及提升應用時的散播均勻度 (Chen *et al*. 2019)。另外，亦可嘗試如氣流和水流噴灑等方法，更快速地於田間操作中釋放卵粒 (Wu 1995)。

草蛉卵柄與卵粒分離的方式，主要有加熱分解、化學溶解 (dissolved) 及物理切斷等方法。Nordlund & Correa (1995a, 1995b) 設計一產卵容器，其分布電熱線 (hot wire) 於產卵面上，加熱後可將卵柄分解熔融，使得卵粒自產卵容器上卸除，並落入收穫系統中。化學溶解法一般以次氯酸鈉 (sodium hypochlorite; NaClO) 溶液為溶劑，將卵柄浸泡於溶劑中使卵柄分解，再將卵以水浴清洗並以紗網過濾回收，存活率可達 30–90% (Krishnamoorthy & Nagarkatti 1981; Nasreen *et al*. 2004; Bezerra *et al*. 2014; Chen *et al*. 2019)。此類溶劑常被應用於溶解昆蟲卵表面的幾丁質構造，但浸泡時間若掌控不當，會直接造成卵表面腐蝕過度，使氯離子進入卵內而造成損傷 (Handler *et al*. 1998)。而浸泡過溶劑的卵，若未即時洗淨且晾乾，卵粒將持續受到溶劑侵蝕，進而引發微生物感染而死亡 (Nordlund & Correa 1995a; Nasreen *et al*. 2004; Bezerra *et al*. 2014)。另外，一般尚有使用尼龍球 (loose ball of nylon netting) 將卵柄拉扯斷裂 (Ridgway *et al*. 1970)，或是刮鬍刀將卵柄切斷的處理方式 (Nasreen *et al*. 2004; Sattar & Abro 2011)，然而此二法皆會使卵柄糾結，甚至造成卵粒直接的損傷 (Nordlund & Correa 1995a)。

本文提出「推剪法」，為一種以電動推剪 (electronic clipper or hair clipper) 搭配旋風分

離法 (cyclonic separation) (Hsiu *et al*. 2019) 之方式，可快速切斷卵柄並收穫大面積的草蛉卵粒，並比較此法與一般次氯酸鈉溶解法，兩者的卵收穫率、孵化率及成蟲獲得率。本研究期望增進草蛉卵粒收穫的效率，並降低操作器械的占用空間。

材料與方法

基徵草蛉飼育

基徵草蛉飼育過程簡述如下：幼蟲用微膠囊人工飼料飼養，並於瓦楞紙片中化蛹。成蟲羽化後，立即收集置入直徑 14 cm × 高 20 cm 的壓克力產卵筒內，以蜂蜜與酵母粉之混合物及沾水棉花餵養，筒內鋪設紙巾供成蟲產卵。每日收取帶有卵粒的紙張，作為卵片備用 (Lee 1994; Hsu & Lu 2020)。

卵粒收穫試驗

推剪法試驗

推剪器動力來源為直流電源 (direct current; DC 24 V) 驅動之直流馬達 (36 W)，並以脈衝信號調控技術來控制刀刃速度。刀頭 (上立儀器有限公司，台灣台中市) 之上刀刃 (blade) 為聚甲醛材質 (polyoxymethylene; POM)，下刀刃為以陽極處理 (anodizing) 之不鏽鋼 (stainless steel)，兩者皆以鐵氟龍 (polytetrafluoroethylene; PTFE) 塗布。本文將測試 3 種不同的推剪器刀頭高度的卵收穫率，試驗流程及旋風分離步驟如圖 2，參考 Hsiu *et al*. (2019) 之作法，使用渦輪扇 (worm gear fan or snail fan) 作為動力源並以雙旋風塔結構將卵粒與雜質分離。試驗時，首先將進氣口靠近推剪器刀口，刀口上方以流量 40 L min^{-1} 進行抽氣使卵柄直立，接著推剪刀刃靠近卵柄基部將卵柄切斷。卵柄斷裂後，會被負壓氣流吸入分離器 (圖 2D)，較重的卵粒被旋風分離並下降留置於分離器底部，而排遺及沙塵隨氣旋上升至分離器頂部隨氣流排出。試驗結束後，計算旋風分離所收穫的卵粒收穫率，並自 3 組剪下的卵粒中各隨機取 30 粒卵 (n = 30)，觀察孵化率及成蟲獲得率。

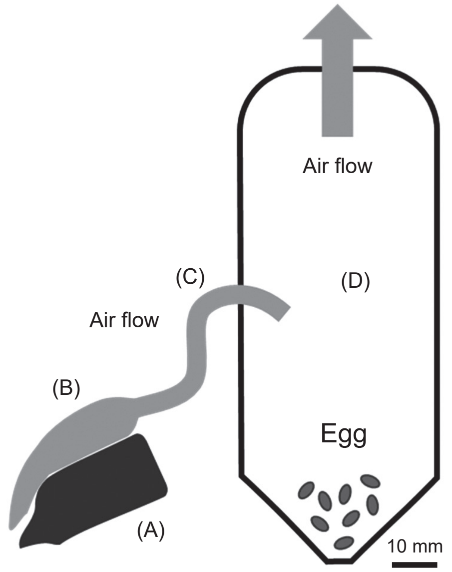

圖 2. 推剪搭配旋風分離器收集基徵草蛉卵粒之構造圖。(A) 推剪將卵之卵柄切斷，並將卵粒由 (B) 空氣驅動之收集器將卵吸入至 (C) 空氣連通管，最終卵粒被 (D) 旋風分離器收集於底部。

Fig. 2. Diagrams of clipper and cyclonic procedure to take the eggs of *Mallada basalis* from substrate. The (A) clipper removes the egg stalk, and a collector driven by (B) air flow inhale the eggs into the (C) connecting tube, and finally these eggs were transported to (D) cyclonic separator.

次氯酸鈉法試驗

由於越高濃度的次氯酸液搭配越長的處理時間，則卵收穫率提高但存活率降低 (Bezerra *et al*. 2014)。本研究依據前測試驗 (附錄)，以不同次氯酸鈉濃度搭配不同處理時間，選出各濃度下卵收穫率與孵化率兩者皆最佳的組合，濃度與時間組合分別選用 1.5% 60 s、3.0% 30 s 及 6.0% 10 s。本試驗首先以剪刀剪取附著草蛉卵粒之卵紙片，接著以鑷子夾取此紙片浸泡於次氯酸鈉溶液中，並計算脫落後的卵粒。以一次過濾水洗淨後乾燥，並自浸泡處理後的卵粒隨機取 30 粒卵 (n = 30)，觀察孵化率及成蟲獲得率。

對照組

以剪刀剪取 30 粒卵 (n = 30)，觀察孵化率及成蟲獲得率。推剪法、次氯酸鈉法及對照

組處理等，皆進行 4 重複。

數據分析

試驗資料以 IBM SPSS Statistics 25 軟體進行統計分析，數據先以變異數同質性檢定 (Levene's test)，若同質性假設通過則以變異數分析 (analysis of variance; ANOVA) 及最小顯著性差異法 (Fisher's least significant difference test; LSD test) 比較 3 種處理間的卵收穫率、孵化率及成蟲獲得率平均值差異。若同質性假設未通過，則以 Welch's ANOVA 及杜納 T3 檢定 (Dunnett's T3 test) 作事後比較 (post hoc test)。

結果與討論

以推剪法及旋風處理法收獲之草蛉卵粒，如圖 3。推剪法與次氯酸鈉法兩種處理結果比較 (表 1)：推剪試驗中以 1 mm 高度之刀頭組別結果最優良，而次氯酸鈉處理組別中以 1.5% 濃度搭配 60 s 處理時間之效果最優。推剪法及次氯酸鈉法處理結果，最優組別比較，卵收穫率分別為 90.2 ± 0.6 vs. 80.0 ± 2.3%，兩組無顯著差異 (Levene's test: $P = 0.048$; Welch's ANOVA: $F_{6,\ 8.00} = 155.43$, $P < 0.001$; Dunnett's T3 test: $P = 0.135$)，孵化率為 80.8% ± 2.8% vs. 70.0% ± 3.6%，兩組間無顯著差異 (Levene's test: $P = 0.119$; ANOVA: $F_{6,\ 21.00} = 110.574$, $P < 0.001$; Fisher's LSD test: $P = 0.142$)，成蟲獲得率為 54.2% ± 3.4% vs. 46.7% ± 4.1%，兩組間無顯著差異 (Levene's test: $P = 0.026$; Welch's ANOVA: $F_{6,\ 8.00} = 849.23$, $P < 0.001$; Dunnett's T3 test: $P = 0.251$)。對照組 (剪刀剪取法) 之卵收穫率、孵化率及成蟲獲得率，則分別為 100.0% ± 0.0%、90.8% ± 1.6%及60.8% ± 0.8%。若以 3 種處理組之卵收穫率最優組別：1 mm 推剪法、60 s 次氯酸鈉法及剪刀剪取法相比較操作之時間效率，操作時間分別為 1 s、60 s 及 2–3 min，以推剪法搭配旋風處理法為最佳，次氯酸鈉法次之，而剪刀剪取之對照組最耗費收穫時間。剪刀法雖具最佳的卵收穫率、孵化率及成蟲獲得率，但所耗費之時間成本巨大，不適合應用於實務操作。推剪法搭配旋風離心法收獲草蛉卵粒，相較於次氯酸鈉法有操作時間及空間應用之優勢，且有較佳的卵收穫率、孵化率及成蟲獲得率。

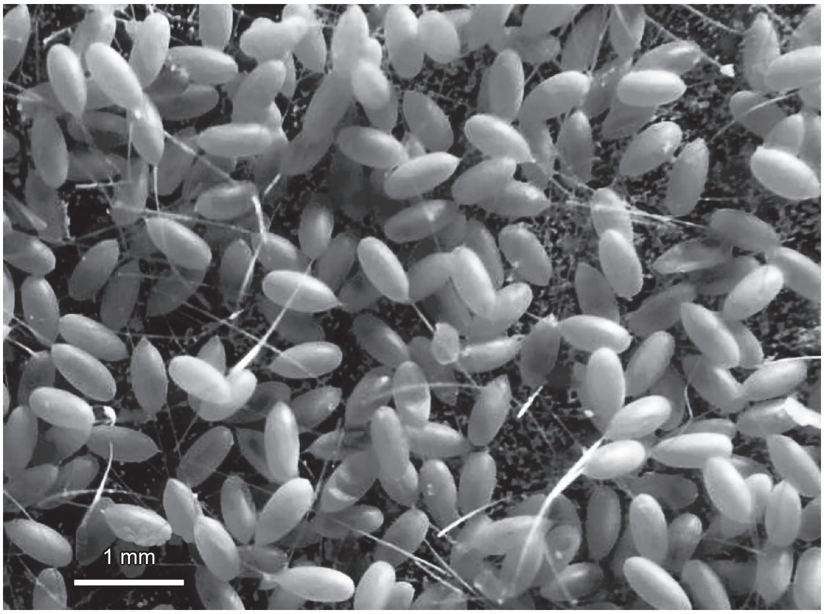

圖 3.　推剪搭配旋風分離法收穫的基徵草蛉卵。

Fig. 3.　Eggs of *Mallada basalis* harvested using a hair clipper with cyclonic separation.

表 1. 推剪法搭配次氯酸鈉溶解法取下基徵草蛉卵粒之成功率、孵化率及成蟲獲得率。

Table 1. Egg harvest (%), hatch (%), and egg-adult (%) for removing the egg stalk of *Mallada basalis* using the clipper and sodium hypochlorite method.

Method of removing egg stalk	Eggs harvest % (Mean ± SEM[z])	Hatch % (Mean ± SEM)	Egg-adult % (Mean ± SEM)
Scissors	100.0 ± 0.0 a[y]	90.8 ± 1.6 a	60.8 ± 0.8 a
Clipper with cyclonic separation			
1 mm	90.2 ± 0.6 ab	80.8 ± 2.8 ab	54.2 ± 3.4 ab
2 mm	63.8 ± 4.8 c	70.8 ± 1.6 b	47.5 ± 1.6 b
3 mm	45.8 ± 1.8 d	54.2 ± 4.4 c	35.8 ± 1.6 cd
Sodium hypochlorite solution			
1.5%, 60 s	80.0 ± 2.3 b	70.0 ± 3.6 b	46.7 ± 4.1 bc
3.0%, 30 s	80.1 ± 4.7 b	51.7 ± 3.2 c	33.3 ± 3.0 d
6.0%, 10 s	78.1 ± 5.1 bc	0.3 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 e

[z] SEM: standard error of the mean.
[y] Mean ± SEM within the same column followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

草蛉卵柄易受重力彎曲，使卵粒緊靠底面，本文設計之推剪法先以負壓氣流拉伸卵柄，使卵粒遠離刀刃，避免受上部刀刃撞擊，並將剪下的卵粒立即移除，以避免受二次剪取造成損傷。提前抽風可除去表面髒污，配合以鐵氟龍塗布之刀刃表面，避免灰塵及成蟲的黏性排遺沾黏於刀刃，造成卵柄黏附。本文採用旋風離心法 (Hsiu *et al*. 2019) 來收穫草蛉卵粒，以避免濾網式吸塵易使大量卵粒於濾網處堵塞且擠壓受損，且濾網處的高速氣流易使卵柄產生靜電，導致卵粒彼此沾黏形成叢集 (clump) 而不易分離 (Nordlund & Correa 1995a)。本文推剪法步驟較以往的化學溶解及電熱熔融 (melted) 法簡易，且操作時間極短、安全性高，並且無化學浸泡法所需之液體空間，無尼龍球或刮鬍刀法造成的卵柄糾結現象，也無電熱法之高耗電帶來的安全問題 (Nordlund & Correa 1995a, 1995b; Bezerra *et al*. 2014)，可有效率的收獲草蛉卵粒並縮小占用空間，有機會發展為小體積之自動收穫系統。

誌謝

本試驗承行政院農業委員會農業試所應用動物組益蟲研究室助理張敏專小姐及王俞良小姐協助執行，謹此致謝。

附錄 以不同濃度及處理時間之次氯酸鈉溶解法取下基徵草蛉卵粒之成功率及孵化率。

Appendix Egg harvest (%) and hatch (%) for removing the egg stalk of *Mallada basalis* using the sodium hypochlorite method with different concentrations and treatment durations.

Sodium hypochlorite concentration (%)	Treatment duration (s)	Eggs harvest % (Mean ± SEM[z])	Hatch % (Mean ± SEM)
1.5	10	18.0 ± 2.5 de[y]	84.9 ± 7.9 a
	30	51.3 ± 3.1 d	73.4 ± 5.4 a
	60	73.2 ± 4.5 bc	76.4 ± 3.2 a
3.0	10	46.0 ± 3.8 d	48.5 ± 4.8 b
	30	79.9 ± 3.6 abc	44.8 ± 6.1 bc
	60	86.5 ± 2.6 ab	26.0 ± 4.2 cd
6.0	10	69.8 ± 4.3 c	7.1 ± 2.4 de
	30	89.5 ± 2.0 a	3.5 ± 1.5 e
	60	92.5 ± 2.9 a	3.4 ± 1.5 e

[z] SEM: standard error of the mean.

[y] Mean ± SEM within the same column followed by the same letters are not significantly different at the 5% levels by least significant difference (LSD) test.

引用文獻

Bezerra, C. E. S., C. H. F. Nogueira, M. M. Sousa, B. Souza, and E. L. Araujo. 2014. Calcium hypochlorite for removing stalks on eggs of the green lacewing *Chrysoperla genanigra* (Neuroptera: Chrysopidae). Appl. Entomol. Zool. 49:483–486. doi:10.1007/s13355-014-0257-z

Chang, C. P. and S. C. Huang. 1995. Evaluation of the effectiveness of releasing green lacewing, *Mallada basalis* (Walker) for the control of tetranychid mites on strawberry. Plant Prot. Bull. 37:41–58. (in Chinese with English abstract)

Chang, S. C. and C. T. Lu. 2007. Differentiation of *Mallada basalis* (Walker) and *Mallada desjardinsi* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae) by 18S rRNA. Formosan Entomol. 27:327–339. (in Chinese with English abstract) doi:10.6661/TESFE.2007026

Chen, C. C., L. L. Cheng, Y. J. Dong, C. T. Lu, W. J. Wu, and J. S. Yaninek. 2014. Using the green lacewing *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae) to control *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae) on papaya in a screenhouse. J. Taiwan Agric. Res. 63:91–104. doi:10.6156/JTAR/2014.06302.01

Chen, H. J., Y. C. Chao, and M. C. Lu. 2019. Optimization and application of lacewing [*Mallada basalis* (Walker)] rearing technique. p.49–59. *in*: Proceedings of Application of Beneficial Insects in Friendly Farming. July 5, 2019. Miaoli, Taiwan. Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Miaoli, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Cheng, L. L., J. R. Nechols, D. C. Margolies, J. F. Campbell, and P. S. Yang. 2010. Assessment of prey preference by the mass-produced generalist predator, *Mallada basalis* (Walker) (Neuroptera: Chrysopidae), when offered two species of spider mites, *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), on papaya. Biol. Control 53:267–272. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.02.006

Cohen, A. C. 1983. Improved method of encapsulating artificial diet for rearing predators of harmful insects. J. Econ. Entomol. 76:957–959. doi:10.1093/jee/76.4.957

Eisner, T., A. B. Attygalle, W. E. Conner, M. Eisner, E. MacLeod, and J. Meinwald. 1996. Chemical egg defense in a green lacewing (*Ceraeochrysa smithi*). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:3280–3283. doi:10.1073/pnas.93.8.3280

Handler, A. M., S. D. McCombs, M. J. Fraser, and S. H. Saul. 1998. The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:7520–7525. doi:10.1073/pnas.95.13.7520

Hsiu, B. C., J. Z. Yu, Y. J. Dong, F. C. Lin, and M. Y. Chiang. 2019. Separation of almond moth [*Cadra cautella* (Walker)] eggs and residual scales using cyclonic separation. J. Taiwan Agric. Res. 68:189–194. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201906_68(2).0008

Hsu, P. C. and C. T. Lu. 2020. An improved core- Shell microcapsule diet for rearing larvae of *Mallada basalis* (Neuroptera: Chrysopidae). Pest Manage. Sci. 76:1121–1127. doi:10.1002/ps.5624

Krishnamoorthy, A. and S. Nagarkatti. 1981. A mass rearing technique for *Chrysopa scelestes* Banks (Neuroptera: Chrysopidae). J. Entomol. Res. 5:93–98.

Lee, W. T. 1994. Technical development of microencapsulated artificial diets for *Mallada basalis* Walker. Chinese J. Entomol. 14:47–52. (in Chinese with English abstract) doi:10.6660/TESFE.1994004

Lu, C. T. and C. L. Wang. 2006. Control effect of *Mallada basalis* on insect pests of nethouse sweet peppers. J. Taiwan Agric. Res. 55:111–120. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2006.05502.04

Ma, A. N., X. D. Zhang, and J. Z. Zhao. 1986. A machine for making encapsulated diet for rearing *Chrysopa* spp. Chinese J. Biol. Control 2:145–147. (in Chinese with English abstract)

Nasreen, A., G. Mustafa, M. Iqbal, and M. Ashfaq. 2004. Viability of eggs of green lacewing harvested by Am-tech and other methods. Pak. J. Biol. Sci. 7:126–127. doi:10.3923/pjbs.2004.126.127

Nordlund, D. A. and J. A. Correa. 1995a. Description of green lacewing adult feeding and oviposition units and a sodium hypochlorite-based egg harvesting system. Southwestern Entomol. 20:293–301.

Nordlund, D. A. and J. A. Correa. 1995b. Improvements in the production system for green lacewings: An adult feeding and oviposition unit and hot wire egg harvesting system. Biol. Control 5:179–188. doi:10.1006/bcon.1995.1022

Ridgway, R. L., R. K. Morrison, and M. M. Badgley. 1970. Mass rearing a green lacewing. J. Econ. Entomol. 63:834–836. doi:10.1093/jee/63.3.834

Sattar, M. and G. H. Abro. 2011. Mass rearing of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) adults for integrated pest management programmes. Pak. J. Zool. 43:483–487.

Wu, T. K. 1992. Feasibility of controlling citrus red spider mite, *Panonychus citri* (Acarina: Tetranychidae) by green lacewing, *Mallada basalis* (Neuroptera: Chrysopidae). Chinese J. Entomol. 12:81–89. (in Chinese with English abstract) doi:10.6660/TES-

FE.1992011

Wu, T. K. 1995. Integrated control of *Phyllocnistis citrella, Panonychuscitri*, and *Phyllocoptrutaoleivora* with periodic releases of *Mallada basalis* and pesticide applications. Chinese J. Entomol. 15:113–123. (in Chinese with English abstract) doi:10.6660/TESFE.1995011

Ye, J., J. Li, Z. Li, and S. Han. 2017. Rearing of *Mallada basalis* (Neuroptera: Chrysopidae) on modified artificial diets. PLOS ONE 12:e0185223. doi:10.1371/journal.pone.0185223

Harvesting of *Mallada basalis* (Walker) Eggs Using a Hair Clipper and Cyclonic Separation

Pei-Chen Hsu[1], Yew-Jen Dong[1], Jih-Zu Yu[2], Feng-Chyi Lin[3], and Ming-Yao Chiang[1,*]

Abstract

Hsu, P. C., Y. J. Dong, J. Z. Yu, F. C. Lin, and M. Y. Chiang. 2020. Harvesting of *Mallada basalis* (Walker) eggs using a hair clipper and cyclonic separation. J. Taiwan Agric. Res. 69(3):255–263.

Mallada basalis (Walker), commonly called the green lacewing, is beneficial for agricultural pest control in Taiwan. The number of green lacewing eggs distributed on a flat surface is limited by a thin stalk structure. Therefore, removal of the egg stalks requires considerable manpower and transportation space. Moreover, it also limits the applicability of such eggs in large-scale experiments and increases the difficulty of field application. In this study, an electric clipper was used to remove lacewing egg stalks, and the eggs were harvested using a cyclone separator. No significant difference was observed in eggs harvest rate (90.2% ± 0.6% vs. 80.0% ± 2.3%) between clipper and sodium hypochlorite method to harvest eggs of *M. basalis*. However, significant differences were measured in hatching rate (80.8% ± 2.8% vs. 70.0% ± 3.6%) and adult harvest rate (54.2% ± 3.4% vs. 46.7% ± 4.1%). Results showed that the use of hair clipper and cyclonic separation method for lacewing egg harvesting had the advantages of high speed, small instrument size, convenient operation, and high safety. As such, this method provides potential applicability in developing a small harvesting system for green lacewing eggs.

Key words: *Mallada basalis* (Walker), Egg stalk, Harvesting, Clipper, Mass rearing.

Received: October 30, 2019; Accepted: June 3, 2020.
[*] Corresponding author, e-mail: mingyaw@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.
[3] Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

謝廷芳／農業試驗所植物病理組

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十九卷　第三期　　中華民國一〇九年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　林學詩
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://www.ipress.tw/J0042

編印　Ainosco Press
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207
　　國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
　2. 五南文化廣場 / 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editor

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultants to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute
Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 69 No. 3 September 30, 2020

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330